

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**ANÁLISIS DE MUTACIONES *KRAS* EN EL ADN DE MUESTRAS FECALES  
EXTRAÍDAS DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL**

**DENNIS CÉSAR LÉVANO LINARES**

2019



**Universidad Autónoma  
de Madrid**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**ANÁLISIS DE MUTACIONES *KRAS* EN EL ADN DE MUESTRAS FECALES  
EXTRAÍDAS DE PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL**

Memoria de DENNIS CÉSAR LÉVANO LINARES para optar al grado de Doctor en  
Medicina

**TUTOR**

**Prof. Dr. DAMIÁN GARCÍA OLMO**

**DIRECTORES**

**Dr. MARIANO GARCÍA ARRANZ**

**Dr. JAIME RUIZ-TOVAR POLO**

Madrid, 2019

*A Patricia, por supuesto.*

## **AGRADECIMIENTOS**



## AGRADECIMIENTOS

### *Las pequeñas cosas...*

Una persona no elige el sitio donde nacer, nacer aquí o allá no tiene ningún mérito, no depende de nosotros, tal parece que aún estoy en deuda contigo Perú, mi tierra, mi país, te agradezco por ser el cielo gris de esos años tan dulces y llenos de todo.

*"Tienes que darles valor a las cosas incluso a las más pequeñas"* me recordaba mi Padre en la niñez, cuánta razón llevabas y cuánto me ha servido esa frase desde entonces, es hora de agradecerte por tus enseñanzas... y por todo aquello que me diste sin pedirme nada a cambio...

*"Madre sólo hay una"*... nunca llegamos a entenderla del todo, aunque pequeña, la grandeza de esta frase. Quizás nunca podré agradecerte lo mucho que hiciste por mi, pero siempre me verás intentándolo, aunque todo lo que haga me sepa a poco.

Me ayudaste cuando más lo necesitaba y eso es difícil de olvidar, siempre nos tendremos el uno al otro hermana, gracias por todo...

Desde mi llegada, a España le debo una gran parte de mi vida, me enseñaste que el futuro fuera del nido era posible, y por eso te respeto... gracias por tan grandes y pequeños momentos...

Me han dirigido capitanes de todos los colores, a quienes les debo toda mi lealtad y mi cariño; A mi tutor DAMIÁN GARCÍA OLMO por ser el capitán de este proyecto y mostrarme la puerta de este mundo científico tan oculto en mí y, a mis tutores MARIANO GARCÍA ARRANZ y JAIME RUÍZ-TOVAR muchas gracias por el apoyo y el empuje, a veces cuando las ganas faltan, palabras como las vuestras ayudan a seguir adelante...

A SUSANA, por ser la otra cara de la moneda en este trabajo... sabes que sin ti esto no hubiera sido posible, tenerte como copiloto ha sido lo mejor de estos años, no sólo por tu

## AGRADECIMIENTOS

ayuda... sino también por tu amistad, tú y todos los que estuvieron allí en ese pequeño lugar (Luz, Alejandro, Arantxa) pueden contar conmigo para siempre.

Deje un puñado de amigos en mi antigua casa... a todos ellos en la FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ... a los adjuntos de la sección de Coloproctología, a Yolanda y todo su grupo, a Federico Rojo y a Laura (por su permiso y complicidad) no me queda más que agradecerles porque sé que de alguna forma son parte de este trabajo.

A mi jefe Manuel Durán, gracias por confiar en mi y darme la oportunidad de seguir adelante en el HOSPITAL REY JUAN CARLOS, lugar que en poco tiempo me ha entregado mucho, gracias a David, Belén, Rocío... sin vosotros los días no tendrían ese matiz.

A todas aquellas personas que se cruzaron, que sorprendieron, que enseñaron... que se quedaron o se fueron (pero no del todo) merecen mucho de mí... hoy es el momento de agradecerles, esto va por ustedes... muchas gracias por entregarme todas esas pequeñas cosas y recorrer conmigo el camino que me trajo hasta aquí.

César

# ÍNDICE

## AGRADECIMIENTOS

LISTADOS DE TABLAS Y FIGURAS	1
------------------------------	---

ABREVIATURAS	9
--------------	---

RESUMEN	15
---------	----

SUMMARY	21
---------	----

INTRODUCCIÓN	25
--------------	----

1. El concepto del Cáncer	27
1.1. Definición	27
1.2. Carcinogénesis	28
1.3. Variación genética	30
1.4. Regulación molecular	32
2. Cáncer Colorrectal	33
2.1. Epidemiología	33
2.1.1. Incidencia	33
2.1.2. Mortalidad	36
2.1.3. Supervivencia	37
2.2. Factores Etiológicos	39
2.2.1. Factores Genéticos	39
2.2.1.1. Herencia y antecedentes familiares	39
2.2.2. Factores Clínicos	44
2.2.3. Factores Conductuales	46
2.2.3.1. Estilos de vida y hábitos tóxicos	46
2.2.3.2. Dieta y consumo de medicamentos	48
2.3. Etiopatogenia	51
2.3.1. Desarrollo morfológico	52
2.3.1.1. Secuencia Pólipo-Carcinoma	52
2.3.1.2. Secuencia Adenoma-Carcinoma	52
2.3.1.3. Vía del pólipo <i>Serrado</i>	55
2.3.1.3.1. Clasificación de pólipos <i>serrados</i>	56
2.3.1.3.2. Alteraciones moleculares de lesiones <i>serradas</i>	57

## ÍNDICE

2.3.1.3.3. Inicio y progresión de la vía del pólipo <i>serrado</i>	59
2.3.1.3.4. Detección y vigilancia de pólipos <i>serrados</i>	60
2.3.2. Fenotipos Moleculares	62
2.3.2.1. Vía de la inestabilidad cromosómica	62
2.3.2.1.1. Mecanismos etiológicos	63
2.3.2.1.2. Anomalías genéticas	65
2.3.2.1.3. Aspectos clínicos	70
2.3.2.2. Vía de la inestabilidad de microsatélites	70
2.3.2.2.1. Sistema de MMR en ADN	71
2.3.2.2.2. Inestabilidad de microsatélites esporádica	71
2.3.2.2.3. Fisiopatología	73
2.3.2.2.4. Aspectos clínicos	75
2.3.2.3. Fenotipo <i>CpG Island Methylator</i>	76
2.4. Diagnóstico	77
2.4.1. Detección precoz	77
2.4.1.1. Guías de cribado	78
2.4.1.2. Opciones de cribado	80
2.4.1.2.1. Pruebas estructurales	81
2.4.1.2.2. Pruebas de Laboratorio	82
2.4.1.2.3. Pruebas Genéticas	83
2.4.1.3. Cribado en pacientes de alto riesgo	87
2.4.1.4. Estrategias para superar barreras de cribado	88
2.4.2. Diagnóstico Molecular	91
2.4.2.1. Mutaciones del gen <i>KRAS</i>	92
2.4.2.2. Técnicas de identificación de la mutación <i>KRAS</i>	95
2.4.2.2.1. Secuenciación	96
2.4.2.2.2. Técnicas de Barrido	97
2.4.2.2.3. Técnicas basadas en PCR a tiempo real	98
2.4.2.2.4. Técnicas de amplificación alelo específica	100
2.4.2.2.5. Técnicas de enriquecimiento basadas en PCR	101
2.4.2.2.6. Técnicas alternativas	101
2.4.2.3. Comparación de los métodos de análisis genético	104
2.4.3. Clasificación por subtipos moleculares	106

2.4.3.1. Caracterización Molecular Integrada	106
2.4.3.2. Perfiles de expresión genética	107
2.4.3.3. Subtipos clasificados por características moleculares	108
2.5. Tratamiento	110
2.5.1. Tratamiento Quirúrgico	110
2.5.2. Quimioterapia más radioterapia neoadyuvante	112
2.5.3. Quimioterapia adyuvante en cáncer de colon localizado	114
2.5.4. Tratamiento del carcinoma metastásico	114
2.5.4.1. Anticuerpos monoclonales anti-EGFR	115
2.6. Pronóstico	118
2.6.1. Factores Pronósticos	118
2.6.1.1. Factores clínicos	119
2.6.1.2. Factores anatomopatológicos	120
2.6.1.3. Factores Quirúrgicos	126
2.6.1.4. Factores Moleculares	127
<b>JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b>	<b>131</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>135</b>
1. Hipótesis	137
2. Objetivos	137
2.1. Objetivo Principal	137
2.2. Objetivos Secundarios	137
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>139</b>
1. Diseño	141
1.1. Selección de pacientes	141
1.1.1. Criterios de inclusión	141
1.1.2. Criterios de exclusión	141
1.2. Tamaño muestral	141
1.3. Recogida de datos	142
1.4. Análisis Moleculares	143

## ÍNDICE

2. Metodología	143
2.1. Recolección de muestras	143
2.1.1. Obtención de muestras fecales	143
2.1.2. Obtención de muestras de tejido tumoral	143
2.2. Extracción de ADN	144
2.2.1. Extracción en muestras de tejido tumoral FFPE para análisis mediante pirosecuenciación.	144
2.2.2. Extracción en muestras de tejido tumoral FFPE y muestras fecales para análisis mediante ddPCR	144
2.3. Detección de mutaciones de <i>KRAS</i>	145
2.3.1. Detección en muestras de tejido tumoral FFPE mediante pirosecuenciación.	145
2.3.2. Detección en muestras de tejido tumoral FFPE y muestras fecales mediante ddPCR.	145
3. Análisis Estadístico	147

## RESULTADOS 149

1. Descriptivos	151
1.1. Aspectos Clínicos	151
1.2. Aspectos anatomopatológicos	153
2. Moleculares	156
2.1. Análisis de mutaciones de <i>KRAS</i> en muestras de tejido tumoral FFPE	156
2.1.1. Análisis mediante pirosecuenciación	156
2.1.1.1. Características clínicas según tipo de mutación	156
2.1.1.2. Tipos de mutaciones <i>KRAS</i>	159
2.1.1.3. Supervivencia según estado mutacional	161
2.1.2. Análisis mediante ddPCR	162
2.1.2.1. Muestras analizadas y representaciones gráficas	162
2.1.2.2. Tejido tumoral <i>KRAS</i> <i>wild-type</i> y/o no <i>KRAS</i> <sup>G12D</sup>	163
2.1.2.3. Tejido tumoral <i>KRAS</i> <sup>G12D</sup>	166
2.2. Análisis de la mutación <i>KRAS</i> <sup>G12D</sup> en muestras fecales	171
2.2.1. Obtención de ADN	171

2.2.2. Mutación <i>KRAS</i> <sup>G12D</sup> en muestras fecales por ddPCR	173
2.2.2.1. Muestras fecales control <i>KRAS wild-type</i>	173
2.2.2.2. Muestras fecales <i>KRAS</i> <sup>G12D</sup>	175
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>179</b>
1. Características del tumor primario	181
2. Evaluación coste-efectividad	187
3. Aplicación de la ddPCR	189
4. Implicación clínica de las mutaciones de <i>KRAS</i>	189
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>197</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>201</b>
<b>ANEXO</b>	<b>225</b>

- **Artículo Publicado**

***"Detection of *KRAS* G12D in colorectal cancer stool by droplet digital PCR"***

***World J Gastroenterol 2017 October 21; 23(39): 7087-7097***

***DOI: 10.3748/wjg. v23.i39.7087. ISSN 2219-2840***



# **LISTADOS DE TABLAS Y FIGURAS**

## LISTADO DE TABLAS

*INTRODUCCIÓN*

<b>Tabla 1.</b>	Historia familiar y riesgo de desarrollar CCR.	<b>41</b>
<b>Tabla 2.</b>	Nuevos criterios clínicos para el CCHNP propuesto por un grupo de colaboración internacional.	<b>44</b>
<b>Tabla 3.</b>	Pautas revisadas de Bethesda para el CCHNP y la inestabilidad de microsatélites.	<b>44</b>
<b>Tabla 4.</b>	Características clínicas y moleculares de lesiones <i>serradas</i> .	<b>59</b>
<b>Tabla 5.</b>	Oncogenes y Genes supresores mutados somáticamente en CCR.	<b>66</b>
<b>Tabla 6.</b>	Comparación de recomendaciones de detección precoz emitidas por diferentes organizaciones para individuos asintomáticos con riesgo medio para CCR.	<b>79</b>
<b>Tabla 7.</b>	Características de pruebas de Cribado.	<b>80</b>
<b>Tabla 8.</b>	Descripciones de población en riesgo.	<b>88</b>
<b>Tabla 9.</b>	Cronograma de detección precoz en síndromes de CCR.	<b>89</b>
<b>Tabla 10.</b>	Tipos de PCR, características y aplicaciones.	<b>92</b>
<b>Tabla 11.</b>	Comparación de métodos de análisis genético.	<b>105</b>
<b>Tabla 12.</b>	Sistemas de Clasificación tumoral.	<b>120</b>
<b>Tabla 13.</b>	Categorías de enfermedad residual en la clasificación TNM.	<b>126</b>

*MATERIALES Y MÉTODOS*

<b>Tabla 14.</b>	Condiciones del ciclo térmico *Se seleccionó una temperatura de 105°C para el cierre y un volumen de muestra de 40 µL.	<b>146</b>
------------------	--	------------

*RESULTADOS*

<b>Tabla 15.</b>	Características epidemiológicas.	<b>152</b>
<b>Tabla 16.</b>	Antecedentes clínicos y analíticos.	<b>153</b>
<b>Tabla 17.</b>	Descripción anatomopatológica.	<b>154</b>
<b>Tabla 18.</b>	Estadificación tumoral según TNM y clasificación de Dukes modificada por Astler- Coller.	<b>155</b>
<b>Tabla 19.</b>	Comparación de los aspectos clínicos y anatomopatológicos según el estado mutacional de <i>KRAS</i> .	<b>158</b>

## LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 20.</b>	Tipos de mutaciones del gen <i>KRAS</i> detectados mediante pirosecuenciación.	<b>160</b>
<b>Tabla 21.</b>	Supervivencia en meses según estado mutacional.	<b>161</b>
<b>Tabla 22.</b>	Resultados en tejido tumoral FFPE mediante ddPCR en el grupo control.	<b>164</b>
<b>Tabla 23.</b>	Resultados en tejido tumoral FFPE mediante ddPCR en el grupo G12D positivos.	<b>167</b>
<b>Tabla 24.</b>	Resultados de la obtención de ADN en muestras fecales.	<b>171</b>
<b>Tabla 25.</b>	Resultados en muestras fecales mediante ddPCR en el grupo control.	<b>173</b>
<b>Tabla 26.</b>	Resultados en muestras fecales mediante ddPCR en el grupo G12D positivos.	<b>175</b>

## LISTADO DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b>	“ <i>Hallmarks of cancer</i> ”. Modificación posterior a Hanahan y Weinberg.	<b>28</b>
<b>Figura 2.</b>	Modelo de progresión tumoral.	<b>30</b>
<b>Figura 3.</b>	Representación de los estados inactivado (A) y activado (B) de la vía canónica de Wnt.	<b>33</b>
<b>Figura 4.</b>	Tendencias en la incidencia de cáncer colorrectal (1975-2013) y tasas de mortalidad (1930-2014) por sexo, EE. UU.	<b>35</b>
<b>Figura 5.</b>	Tendencias en la incidencia de cáncer colorrectal (1975-2013) y tasas de mortalidad (1970-2014) por raza/etnia, EE. UU.	<b>35</b>
<b>Figura 6.</b>	Tasa de incidencia de cáncer colorrectal (2009-2013) y mortalidad (2010-2014) por raza/etnia y sexo, EE. UU.	<b>37</b>
<b>Figura 7.</b>	Tendencias en las tasas de supervivencia relativa a 5 años para el cáncer colorrectal por estadio y localización, Estados Unidos, 1975- 2012. Todos los pacientes fueron seguidos hasta 2013.	<b>38</b>
<b>Figura 8.</b>	Secuencia de adenoma-carcinoma.	<b>53</b>
<b>Figura 9.</b>	La vía del pólipo o adenoma <i>serrada</i> sésil.	<b>60</b>
<b>Figura 10.</b>	Desarrollo morfológico del cáncer colorrectal.	<b>61</b>
<b>Figura 11.</b>	Vías moleculares del CCR asociado a MSI.	<b>74</b>

## LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Figura 12.</b>	Esquema de actuación de la proteínas KRAS a través de la señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR).	<b>91</b>
<b>Figura 13.</b>	Porcentaje de mutaciones genéticas en carcinomas de colon y recto.	<b>93</b>
<b>Figura 14.</b>	Frecuencia de mutaciones <i>KRAS</i> .	<b>94</b>
<b>Figura 15.</b>	Esquema de bloqueo de la región extracelular de EGFR por parte de cetuximab y panitumumab.	<b>95</b>
<b>Figura 16.</b>	Representación esquemática de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en (A) tiempo real y (B) PCR digital.	<b>103</b>
<b>Figura 17.</b>	La taxonomía del cáncer colorrectal de acuerdo con el Consorcio de Subtipo de cáncer colorrectal.	<b>108</b>
<b>Figura 18.</b>	Categorización en cinco subtipos según el estado de MSI y CIMP y la presencia de mutaciones de <i>BRAF</i> y <i>KRAS</i> .	<b>110</b>
<b>Figura 19.</b>	Representación esquemática de los anticuerpos monoclonales cetuximab y panitumumab, y la vía de señalización intracelular dependiente del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).	<b>115</b>
<b>RESULTADOS</b>		
<b>Figura 20.</b>	Distribución de pacientes según localización de tumor primario.	<b>151</b>
<b>Figura 21.</b>	Estado de la mutación <i>KRAS</i> distribuido según la localización del tumor primario.	<b>157</b>
<b>Figura 22.</b>	Distribución de las mutaciones de <i>KRAS</i> en el codon 12 y 13.	<b>159</b>
<b>Figura 23.</b>	Gráficas comparativas entre estado <i>wild-type</i> y mutado en cuanto a SLE (A) y SG (B).	<b>162</b>
<b>Figura 24.</b>	Gráficos de amplitud 1D de la muestra FFPE-56, control <i>wild-type</i> . A: canal 1: eventos positivos de fondo (azul). B: canal 2: eventos positivos de secuencia <i>KRAS</i> nativa o <i>wild-type</i> (verde).	<b>165</b>
<b>Figura 25.</b>	A. Gráfico de amplitud 2D de la muestra FFPE-56, control <i>wild-type</i> . B. Gráfico que representa todas las réplicas realizadas de la muestra FFPE-56, control <i>wild-type</i> . Los eventos positivos en FAM (azul) corresponden a gotas que contienen moléculas de DNA portadoras de la mutación y en HEX (verde) gotas que contienen moléculas con la secuencia nativa o <i>wild-type</i> .	<b>166</b>

## LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

- Figura 26.** Gráficos de amplitud 1D de la muestra FFPE-17, positiva para  $KRAS^{G12D}$ . A: el canal 1: eventos positivos para la mutación  $KRAS^{G12D}$  (azul). B: canal 2: eventos positivos para  $KRAS$  *wild-type* (verde). **168**
- Figura 27.** A. Gráfico de amplitud 2D de la muestra FFPE-17, positiva para  $KRAS^{G12D}$ . B. Gráfico que representa todas las replicas realizadas de la muestra FFPE-17, positiva para  $KRAS^{G12D}$ . Los eventos positivos en FAM (azul) corresponden a gotas que contienen moléculas de ADN portadoras de la mutación y en HEX (verde) gotas que contienen moléculas con la secuencia nativa. **168**
- Figura 28.** Gráfico comparativo del número de eventos positivos de réplicas entre la muestra control *wild-type* FFPE-56 y la muestra positiva para  $KRAS^{G12D}$  FFPE-17. **169**
- Figura 29.** Gráfico comparativo de la concentración en copias por microlitro de  $KRAS^{G12D}$  (azul) y  $KRAS$  nativo (verde) entre la muestra control *wild-type* FFPE-56, y la muestra positiva para  $KRAS^{G12D}$  FFPE-17. **170**
- Figura 30.** Gráfico comparativo de la abundancia (%) de ADN mutado con respecto del total en la mezcla de ambas réplicas de la muestra FFPE-56, control *wild-type*, frente a la muestra FFPE-17, positiva para  $KRAS^{G12D}$ . **170**
- Figura 31.** Espectro de absorbancia del ADN obtenido a partir de muestras fecales. A: muestra control, procedente de un paciente con  $KRAS$  nativo o *wild-type* (MB-63). B: muestra de un paciente con  $KRAS^{G12D}$  (MB-12). C: muestra de un paciente con  $KRAS^{G12D}$  (MB-17) con baja concentración de ADN. D: muestra de un paciente con  $KRAS^{G12D}$  (MB-64) en el que destaca la presencia de un pico de absorbancia a 230 nm. **172**
- Figura 32.** A. Gráfico de amplitud 2D de la muestra control *wild-type* MB-63. Se observa un evento positivo mutado residual que se considera señal de fondo. B. Gráfico que representa todas las réplicas realizadas de la muestra MB-63. **174**
- Figura 33.** A. Gráfico de amplitud 2D de la muestra positiva para  $KRAS^{G12D}$  MB-17. B. Gráfico que representa todas las replicas realizadas de la muestra MB-17, positiva para  $KRAS^{G12D}$ . **176**

## LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

- Figura 34.** A. Gráfico de amplitud 2D de la muestra negativa para *KRAS*<sup>G12D</sup> MB-64. B. Gráfico que representa todas las replicas realizadas de la muestra MB-64, negativa para *KRAS*<sup>G12D</sup>. 177
- Figura 35.** Gráfico comparativo de la concentración en copias por microlitro de *KRAS*<sup>G12D</sup> (azul) y *KRAS* nativo (verde) entre la muestra control *wild-type* MB-63, la muestra positiva para *KRAS*<sup>G12D</sup> MB-17 y la muestra negativa para *KRAS*<sup>G12D</sup> MB-64. 178
- Figura 36.** Gráfico comparativo de la abundancia (%) de ADN mutado con respecto del total en la mezcla de réplicas de la muestra control *wild-type* MB-63, la muestra positiva para *KRAS*<sup>G12D</sup> MB-17 y la muestra negativa para *KRAS*<sup>G12D</sup> MB-64. 178

## **ABREVIATURAS**

• <b>5-FU</b>	5-fluorouracilo
• <b>6-TG</b>	6-tioguanina
• <b>ACG</b>	<i>American College of Gastroenterology</i>
• <b>ACP</b>	<i>American College of Physicians</i>
• <b>ACS</b>	<i>American Cancer Society</i>
• <b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
• <b>ADNc</b>	ADN circulante
• <b>AINES</b>	antiinflamatorios no esteroideos
• <b>AOM</b>	azoximetano
• <b>APC</b>	<i>adenomatous polyposis coli</i>
• <b>ARN</b>	ácido ribonucleico
• <b>ARNm</b>	ácido ribonucleico mensajero
• <b>AST</b>	adenomas <i>serrados</i> tradicionales
• <b>ATM</b>	ataxia telangiectasia mutada
• <b>BUB1</b>	<i>budding uninhibited by benzimidazoles 1</i>
• <b>CCHNP</b>	cáncer de colon hereditario no polipósico
• <b>CCR</b>	cáncer colorrectal
• <b>CCRm</b>	cáncer colorrectal metastásico
• <b>CEA</b>	antígeno carcinoembrionario
• <b>CEP</b>	colangitis esclerosante primaria
• <b>CIMP</b>	fenotipo metilador de islas CpG
• <b>CIMP-H</b>	CIMP-High
• <b>CIN</b>	inestabilidad cromosómica
• <b>CMS</b>	<i>Consensus Molecular Subtype</i>
• <b>coloTAC</b>	colonografía por tomografía computarizada
• <b>COX-2</b>	ciclooxigenasa-2
• <b>CU</b>	colitis ulcerosa
• <b>DCC</b>	<i>deleted in colorectal carcinoma</i>
• <b>ddPCR</b>	droplet digital PCR
• <b>DGGE</b>	electroforesis en gel gradiente desnaturizante
• <b>dHPLC</b>	cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante
• <b>DM2</b>	diabetes mellitus tipo 2



## ABREVIATURAS

• EC	enfermedad de Crohn
• EE. UU.	Estados Unidos
• EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
• EII	enfermedad inflamatoria intestinal
• EMAST	<i>elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide</i>
• EMC	escisión mesocólica completa
• EMT	escisión mesorrectal total
• EPC	exceso de peso corporal
• ERK	cinasa regulada por señal
• ESMO	Sociedad Europea para la Oncología Médica
• FCA	focos de criptas aberrantes
• FDA	Food and Drug Administration
• FFPE	fijado con formalina y embebido en parafina
• FIT	pruebas inmunoquímicas fecales
• GTP	trifosfato de guanosina
• HRM	análisis de alta resolución de fusión
• ICC	índice circunferencia/cintura
• IGFBP7	proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7
• IMC	índice de masa corporal
• JPS	síndrome de poliposis juvenil
• KIF11	<i>kinesin family member 11</i>
• LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i>
• LOH	pérdida de heterocigosidad
• MAD	<i>mitotic arrest-deficient</i>
• MAPK	<i>Mitogen-Activated protein Kinases</i>
• MMR	<i>miss-match repair</i>
• MSI	inestabilidad de microsatélites
• MSI-H	<i>MSI High</i>
• MSI-L	<i>MSI Low</i>
• MSS	estabilidad de microsatélites
• NF-kB	factor nuclear-kB
• P/ASS	pólipo/adenoma <i>serrado</i> sésil

• <b>PAF</b>	poliposis adenomatosa familiar
• <b>PAFA</b>	poliposis adenomatosa familiar atenuada
• <b>PAM</b>	poliposis asociada al gen MUTYH
• <b>PCR-ASA</b>	reacción en cadena de polimerasa <i>Allele-Specific Amplification</i>
• <b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
• <b>PH</b>	pólipos hiperplásicos
• <b>POLE</b>	polimerasa E
• <b>PSD</b>	pólipos <i>serrados</i> displásicos
• <b>QRT</b>	quimio/radioterapia
• <b>QT</b>	quimioterapia
• <b>RAG</b>	ratio de afectación ganglionar
• <b>RpC</b>	respuesta patológica completa
• <b>RT</b>	radioterapia
• <b>RT-PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
• <b>SCNA</b>	alteraciones del número de copias somáticas
• <b>SG</b>	supervivencia global
• <b>SLE</b>	supervivencia libre de enfermedad
• <b>SNG</b>	secuenciación <i>next generation</i> .
• <b>SOH</b>	sangre oculta en heces
• <b>SPS</b>	Síndrome de poliposis <i>Serrrada</i>
• <b>SSCP</b>	polimorfismos en la conformación de hebras monocatenarias
• <b>TCF/LEF</b>	factor de células T/potenciador linfoide
• <b>TCGA</b>	<i>The Cancer Genoma Atlas</i>
• <b>TGF-<math>\beta</math></b>	factor de crecimiento transformante $\beta$
• <b>TGF<math>\beta</math>R2</b>	receptor tipo II del TGF- $\beta$
• <b>UFT</b>	uracilo/tegafur
• <b>USPSTF</b>	<i>US Preventive Service Task Force</i>
• <b>VEGF</b>	factor de crecimiento vascular endotelial

## **RESUMEN**

**INTRODUCCIÓN.** Actualmente, el cáncer colorrectal (CCR) continúa mostrando unos altos índices de incidencia en todo el mundo. La evolución en sistemas de cribado ha logrado establecer diagnósticos en etapas precoces de la enfermedad, cuando casi la mayoría de los protocolos de tratamiento son exitosos, consiguiendo una mejoría en la supervivencia global (SG) de los pacientes. En el manejo clínico y terapéutico del CCR se requiere del análisis de biomarcadores moleculares, como las mutaciones *KRAS* o *BRAF*, las cuales están asociadas con la aparición de resistencia a la terapia con agentes biológicos. El genotipado tumoral generalmente se realiza utilizando el ácido desoxirribonucleico (ADN) extraído de biopsias de tejido fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE), aunque en los últimos años se han realizado estudios sobre el ADN libre obtenido de muestras sanguíneas. En etapas tempranas de la enfermedad, los niveles de copias mutadas del ADN circulante (ADNc) pueden ser, en algunos casos, demasiado bajos para su detección. Por lo tanto, es necesario métodos alternativos extremadamente sensibles y no invasivos para mejorar la detección y lograr una cuantificación precisa de estos biomarcadores. Las muestras fecales son una fuente alternativa y no invasiva de material genético para el genotipado de lesiones tumorales en el CCR. Hasta la fecha, se han propuesto varias estrategias basadas en el análisis de marcadores moleculares en muestras fecales, aunque su aplicación en la práctica clínica sigue siendo limitada debido a su costo elevado y sensibilidad reducida en etapas tempranas de la enfermedad.

**OBJETIVOS.** El objetivo principal de este estudio fue evaluar el potencial diagnóstico de la PCR digital (ddPCR) para detectar la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> en el ADN obtenido de muestras fecales de pacientes con CCR, como prueba de concepto de la aplicabilidad de esta tecnología como método no invasivo para el estudio de biomarcadores clínicamente relevantes asociados al ADN de muestras fecales.

**MÉTODOS.** Fue necesario el desarrollo de una metodología adecuada para la obtención de ADN humano, desde muestras fecales de pacientes con CCR, en una cantidad y calidad aceptables para su estudio. Una vez obtenido dichas muestras de ADN y utilizando la tecnología ddPCR se detectó la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup>, comparando posteriormente dichos resultados con la técnica de pirosecuenciación, la cual se utiliza de forma estándar en la actualidad para la detección de mutaciones en tejido tumoral FFPE.

## RESUMEN

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN.** Se recolectó e incluyó en el estudio las muestras de tejido tumoral FFPE y muestras fecales de un total de 70 pacientes con CCR. Se dividieron los subgrupos según la localización del tumor primario: 26 en colon DERECHO (37,2%), 36 en colon IZQUIERDO (51,4%) y 8 en RECTO (11,4%). Del total, se detectó mediante pirosecuenciación la mutación del gen *KRAS* en 33 muestras de tejido tumoral FFPE (47,1%) y 37 fueron catalogadas como *KRAS wild-type* (52,9%). La mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> establecida previamente mediante pirosecuenciación fue detectada mediante la tecnología de ddPCR en el ADN derivado del tumor FFPE en el 100% de los casos y en el 80% del ADN derivado de muestras fecales de pacientes con CCR.

La tecnología ddPCR, que ha mejorado la sensibilidad en la detección de mutaciones de alelos minoritarios en bajas concentraciones de ADN a partir de fluidos biológicos, como plasma y orina, se basa en reacciones de amplificación de hasta diez mil gotas microscópicas en una escala de nanolitros, logrando la amplificación por PCR de las moléculas contenidas en cada gota. En el campo de la Oncología, el análisis de fluidos biológicos está ganando un interés creciente como una herramienta no invasiva y predictiva de gran valor clínico para controlar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento haciendo innecesarias las biopsias en serie.

Este es el primer estudio que describe la detección de la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> en el ADN derivado de heces de pacientes con CCR utilizando una plataforma de ddPCR disponible en el mercado, incluso en individuos con etapas tempranas de la enfermedad. ddPCR sirvió como una herramienta confiable para detectar esta mutación clínicamente relevante en el ADN derivado de heces de pacientes con CCR. Se han investigado varias estrategias basadas en heces que involucran PCR digital para analizar mutaciones relevantes para el manejo del CCR. Sin embargo, ninguno de estos enfoques ha sido desarrollado y sometido a validación clínica para la detección de ADN en heces hasta la fecha. Las ventajas de la tecnología ddPCR, junto con la instrumentación y los protocolos que puede adoptar cualquier laboratorio, respaldan una posible traducción de este enfoque a los escenarios clínicos. Nuestros resultados muestran que la detección de la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> en el ADN derivado de heces por ddPCR es un enfoque rápido, simple y asequible que podría adaptarse para detectar otros biomarcadores moleculares clínicamente relevantes para el manejo del CCR. A la luz de nuestros resultados, se podría proponer que el análisis de biomarcadores por ddPCR en muestras de heces puede complementar los métodos actuales de detección de CCR.

**CONCLUSIONES.** El método preoperatorio desarrollado en este estudio permite la obtención de ADN humano a partir de muestras fecales de pacientes diagnosticados de CCR en una concentración y pureza suficientes para su análisis mediante ddPCR.

La detección de la mutación G12D del gen *KRAS* mediante ddPCR en el ADN obtenido a partir de tejido tumoral FFPE es eficaz y equiparable con los resultados obtenidos mediante pirosecuenciación. Esta mutación tuvo una incidencia mayoritaria en los pacientes incluidos en nuestro grupo de estudio.

Por otro lado, la detección de la mutación G12D del gen *KRAS* mediante ddPCR en el ADN obtenido a partir de muestras fecales de pacientes con CCR es factible y reproducible y en la mayor parte de los casos es comparable con la técnica de pirosecuenciación.

La mutación del gen *KRAS*, la cual se indentificó en su mayoría de los casos en tumores localizados en colon izquierdo, se asoció a una menor supervivencia libre de enfermedad en el seguimiento clínico postoperatorio en los pacientes estudiados.

## **SUMMARY**

**INTRODUCTION.** Nowadays, colorectal cancer (CRC) continues to show very high rates of incidence throughout the world. The evolution in screening systems has managed to establish diagnoses in early stages of the disease, when almost the majority of treatment protocols are successful, achieving an improvement in the overall survival (OS) of patients. CRC clinical and therapeutic management requires the analysis of molecular biomarkers, such as *KRAS* or *BRAF* mutations, which are associated to biological therapy resistance. Generally, tumor genotyping is performed using deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue (FFPE), although studies on free DNA obtained from blood samples have been conducted in recent years. On early stages of the disease, levels of mutated copies of circulating DNA (cDNA) may be too low to be detection. Therefore, is necessary to find alternative sensible and non-invasive methods to improve screening and precise detection of these biomarkers. Stool samples are a non-invasive alternative for genotyping of tumor lesions in the CRC. To date, several strategies have been proposed based on the analysis of molecular markers in stool samples but have a limited use in clinical practice due to its elevated cost and low sensibility at early stages of the disease.

**OBJETIVES.** The main objective of this study was to evaluate the diagnostic potential of digital PCR (ddPCR) to detect the *KRAS*<sup>G12D</sup> mutation in the DNA obtained from fecal samples from patients with CRC, as proof of concept of the applicability of this technology as a non-invasive method for the study of clinically relevant biomarkers associated with DNA from stool samples.

**METHODS.** It was necessary to develop a suitable methodology for obtaining human DNA from stool samples, in an acceptable quantity and quality for their study. Once these DNA samples were obtained and using the ddPCR technology, the *KRAS*<sup>G12D</sup> mutation was detected. Later, we compared our results with those obtained with the pyrosequencing technique, which is the standard to detect mutations on tumoral tissue.

**RESULTS AND DISCUSSION.** We obtained tumoral tissue processed with FFPE and stool samples from 70 CRC. They were divided into subgroups according to localization of the primary tumor: 26 in the right colon (37.2%), 36 on left colon (51.4%) and 8 on the rectum (11.4%). Using pyrosequencing technique, we detected *KRAS* on 33 samples of FFPE tumoral tissue (47.1%) and 37 were catalogued as *KRAS* wild-type (52.9%).



## SUMMARY

*KRAS*<sup>G12D</sup> mutation previously established by pyrosequencing was detected on the DNA derived from the FFPE tumor tissue in 100% of the cases and in 80% of the DNA derived from stool samples using ddPCR technology.

The ddPCR technology has improved sensibility on the detection of minority alleles mutations on low concentrations of DNA obtained from biological fluids, such as plasma or urine, is based on amplification reactions of up to ten thousand microscopic droplets on a nanoliter scale, achieving the amplification by PCR of the molecules contained in each drop. In the field of Oncology, the analysis of biological fluids is gaining increasing interest as a non-invasive and predictive tool of great clinical value to control the progression of the disease and its response to treatment, making biopsies unnecessary.

This is the first study that describes the detection of *KRAS*<sup>G12D</sup> mutation in the DNA derived from stool samples of CRC patients using the ddPCR platform available on the market. ddPCR was useful and reliable, even on patients at early stages of the disease. There are some other techniques based on the analysis of stool samples involving digital PCR to detect mutations, but there hasn't been fully developed or validated. Our results show that detection of the mutation *KRAS*<sup>G12D</sup> on DNA taken from stool samples, is a fast, simple and accesible approach, that could be adapt in order to detect clinically relevant biomarkers in the management of CRC. In light of our results, it could be suggesting that ddPCR on stool samples could complement current methods of detection of CRC.

**CONCLUSIONS.** The method used in this study, allows the collection of human DNA from stool samples of CRC patients, on a concentration and purity sufficient enough to make its ddPCR analysis possible.

The G12D mutation from *KRAS* *gen*, detected on DNA from FFPE tumoral tissue procesed by pyrosequencing technique, has a predominant incidence on CRC patients included on our study.

On the other hand, detection of G12D mutation through ddPCR on DNA obtained from stool samples from CRC patients, is feasible and replicable. Plus, in most of cases, it is comparable with the pyrosequencing technique.

Mutation of the *KRAS* gene, which was identified in the majority of cases in tumors located in the left colon, was associated with a lower disease-free survival in the postoperative clinical follow-up in the patients studied.

# **INTRODUCCIÓN**

### 1. El concepto del Cáncer

#### 1.1. Definición

El cáncer es el resultado de un acúmulo de cambios genéticos y epigenéticos en un clon celular que consigue alterar la correcta regulación de las funciones celulares básicas(1). Una teoría de la naturaleza genética del cáncer fue propuesta por el biólogo alemán Theodore Boveri en 1914 en su artículo *Concerning the Origin of Malignant Tumours*(2). Este artículo argumentaba que el cáncer se inicia a partir de una sola célula, la cual adquiere una capacidad de división incontrolada. La idea del cáncer como una enfermedad monoclonal obtuvo un fuerte apoyo en años posteriores, aunque la inestabilidad genética subyacente, cuyo resultado es una acumulación de alteraciones en la progenie celular, es actualmente poco conocida. En 1976, Nowell sugirió que el desarrollo del cáncer seguía las reglas de la evolución, lo cual implica una selección natural de cualquier tipo de cambio que logre un beneficio en la supervivencia celular, originando una expansión clonal(3). Esta teoría también planteaba que un tumor primario hasta cierto punto podría ser genéticamente heterogéneo.

Actualmente, el cáncer supone una de las enfermedades con mayor impacto en la salud pública mundial. Más de quince millones de nuevos casos son diagnosticados anualmente, siendo la segunda causa de mortalidad en el mundo sólo por detrás de las enfermedades cardíacas. Se engloba dentro del concepto del cáncer a todas aquellas patologías en las que existe una proliferación celular excesiva debido a fallos en los mecanismos de control del crecimiento y muerte celular. Constituye un proceso dinámico, que comienza tras la alteración genética de una sola célula y que continúa con la adquisición de mutaciones que contribuyen al crecimiento celular. En la fase final de esta patología, las células alteradas son capaces de propagarse a través del sistema sanguíneo o linfático e invadir órganos diana distantes al foco tumoral primario. La gravedad de las patologías cancerígenas es altamente variable, depende de factores tales como la naturaleza del tumor, su localización o grado de desarrollo.

Como se ha mencionado, el cáncer es un proceso dinámico en el que sucesivas mutaciones son capaces de transformar progresivamente una célula de características normales en una lesión tumoral metastásica con capacidad invasiva. El número y la naturaleza de las mutaciones necesarias para lograr esta transformación han sido largamente estudiadas durante décadas. El estudio microscópico del tejido de órganos

## INTRODUCCIÓN

afectados por alteraciones tumorales permitió distinguir diferentes etapas dentro del proceso de la carcinogénesis.

### 1.2. Carcinogénesis

En el año 2000, Hanahan y Weinberg presentaron un modelo de progresión tumoral basado en seis capacidades que una célula normal adquiriría a lo largo de su transformación maligna y las denominaron "*The Hallmarks of cancer*"(4), las cuales incluían la capacidad de producción sostenida de señales de crecimiento, la resistencia a la muerte celular o apoptosis, la inducción y/o mantenimiento de la angiogénesis, la insensibilidad a los inhibidores o supresores de crecimiento celular, la capacidad proliferativa ilimitada y la movilidad extratumoral y metástasis. En 2011, se añadieron a esta lista dos características importantes: la inestabilidad del genoma en el ADN y la presencia de inflamación promovida por el propio tumor. Dos marcadores emergentes también fueron incluidos: la capacidad de evadir la destrucción celular por parte del sistema inmune y la posibilidad de adaptar el metabolismo energético celular a los requerimientos propios del tumor (5) (Figura 1).

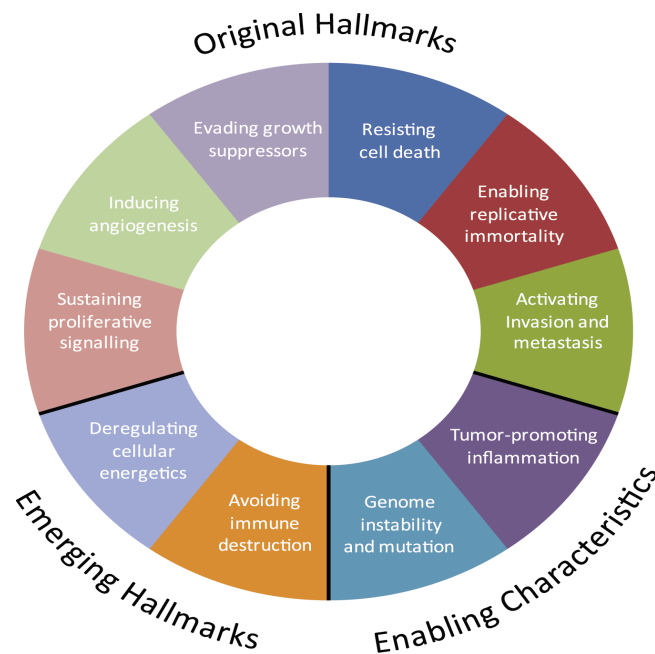


Figura 1. "*Hallmarks of cancer*". Modificación posterior a Hanahan y Weinberg(5)

Además de proponer un modelo de progresión tumoral, Hanahan y Weinberg también realizaron una breve descripción del microambiente tumoral, ya que el estroma extracelular y las células adyacentes al tumor pueden contribuir a la carcinogénesis o suprimir el desarrollo del cáncer. Los cambios observados pueden ser causados por las propias células cancerígenas para promover un mayor crecimiento del tumor o ser el resultado de los diferentes mecanismos de defensa del organismo contra el carcinoma. Esto implica que las diferentes capacidades de promoción del cáncer no sólo deben considerarse un resultado originado en las células tumorales, sino como una suma de interacciones entre las células cancerígenas y el microambiente tumoral. Según su planteamiento, el tumor debe concebirse como un sistema dinámico y complejo en el que participan diferentes líneas celulares con diversas funciones que se complementan entre sí (Figura 2). El tipo celular más frecuente son las células cancerosas, las cuales derivan de la célula desencadenante de la neoplasia y constituyen el grueso de la masa tumoral. Suelen ser homogéneas en la fase inicial del tumor transformándose en base a la adquisición de nuevas competencias oncogénicas. Entre estas células tumorales mayoritarias, se encuentran las células madre cancerosas, las cuales tienen un grado de diferenciación menor y son capaces no sólo de autopropagarse, como las células cancerosas normales, sino también de generar otros tipos de células tumorales. Las células endoteliales forman los vasos presentes en el tumor. Tras una activación por alguna de las vías proangiogénicas, las células endoteliales pasan de un estado latente a desarrollar nuevos vasos sanguíneos y linfáticos capaces de nutrir a las células tumorales y permitiendo la evacuación de desechos celulares. Además, numerosos tipos de células inflamatorias del sistema inmune se sitúan en el microambiente tumoral. Las células incluidas en este grupo abarcan subtipos de macrófagos, mastocitos, neutrófilos y los linfocitos T y B. Estas células logran una respuesta proinflamatoria, estableciendo un soporte en la angiogénesis tumoral, una estimulación en la proliferación celular del tumor y facilitando la invasión y/o el establecimiento celular en un nuevo tejido generando las metástasis. Por otro lado, los fibroblastos asociados contribuyen a la formación del estroma tumoral. En este estroma existen además células madre y progenitoras del estroma tumoral, que reponen los diferentes tipos celulares que se localizan en este entorno.

## INTRODUCCIÓN

### 1.3. Variación genética

La progresión y malignización tumoral es consecuencia del desarrollo de cambios genéticos ligados a funciones metabólicas: las mutaciones que facilitan el crecimiento se establecen fijas en el tumor, por lo que los clones que las portan se encontrarán sobrerrepresentados tras un tiempo de desarrollo tumoral. Este proceso se asemeja en cierta manera al proceso de la evolución de las especies. Así, según el modelo propuesto por Vogelstein cada mutación con efecto “protumoral” incrementaría la tasa de crecimiento un 0,4% de media respecto al equilibrio neutro división/senescencia. La acumulación de múltiples variantes que facilitan el crecimiento y la ventaja proliferativa asociada a ellas generarán paulatinamente una lesión tumoral, la cual irá creciendo y malignizándose progresivamente (Figura 2).

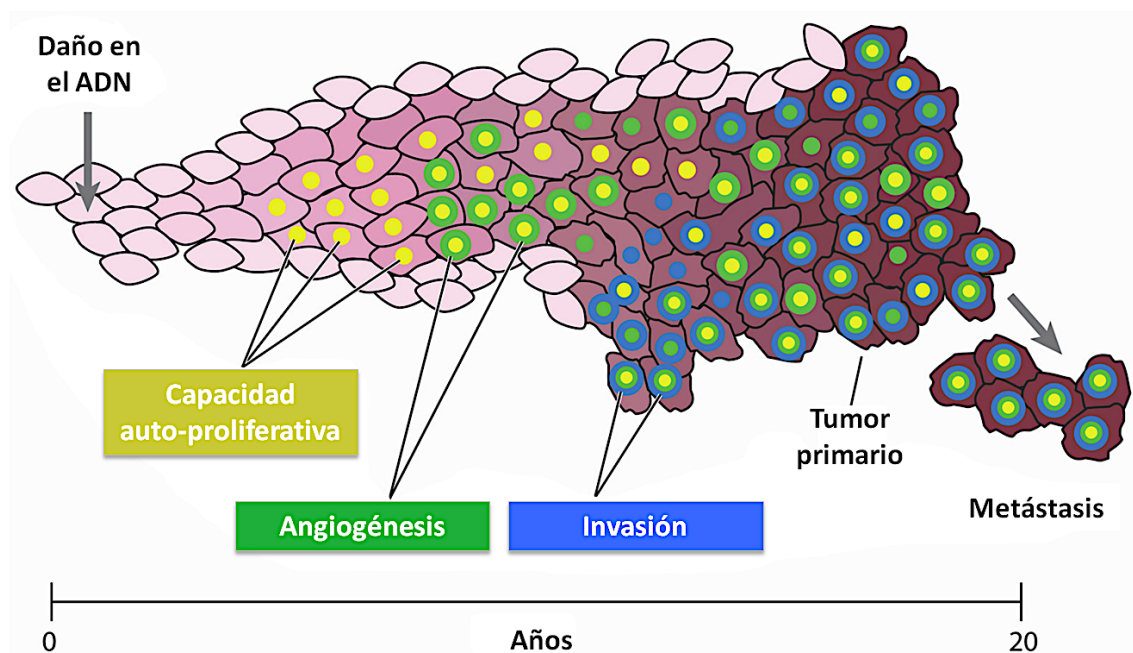


Figura 2. Modelo de progresión tumoral (Salk, 2010)

Aunque los tumores en personas de mayor edad conllevan un número muy superior de mutaciones que las neoplasias infantiles, en ambos casos se encuentran las obligatorias para generar una lesión tumoral. Esto indicaría que son pocas las mutaciones necesarias para conducir el proceso tumoral (**mutaciones conductoras**) y que el resto, son meramente cambios “accidentales” que no juegan un papel relevante en el desarrollo neoplásico (**mutaciones pasajeras**). En ausencia de una predisposición al cáncer, se

requiere un largo periodo de tiempo para que las mutaciones conductoras se establezcan simultáneamente en una célula. Esto explicaría la baja frecuencia de tumores esporádicos en niños. Las mutaciones conductoras afectan generalmente a genes que juegan un papel clave en la regulación y mantenimiento de la integridad celular. Hasta ahora, sólo unos 140 (de 28.000 genes en todo el genoma humano) han sido identificados como genes portadores de mutaciones conductoras, los cuales además pueden clasificarse en dos categorías bien diferenciadas:

- a. **Protooncogenes**, genes que al ser activados y transformados por diversos mecanismos se les denomina oncogenes, los cuales estimulan la proliferación y promueven el desarrollo de malignidad(6) y son considerados “objetivos” clave en el tratamiento del cáncer. Los cambios genéticos y epigenéticos tales como la hipometilación global, hipermetilación de islas CpG específicas, la pérdida de impresión y modificaciones de histonas, modifican la expresión genética y mediante el silenciamiento de supresores tumorales o la activación de oncogenes, pueden contribuir a la carcinogénesis. Las mutaciones establecidas generan proteínas igualmente activas y anormalmente reguladas, por lo que generalmente se trata de cambios específicos en posiciones muy concretas.
- b. **Supresores tumorales**, son genes con funciones de control y/o protección de la estabilidad celular, por lo que la inactivación de este grupo de genes puede conducir a una transformación maligna(7). Por ejemplo, eliminan aquellas células con graves daños en el ADN y previenen la división celular excesiva. Esto es posible mediante la inhibición de la progresión del ciclo celular o mediante la activación del programa de apoptosis. A diferencia de los protooncogenes, el espectro de mutaciones conductoras es mucho más amplio.

Además, existe un tercer grupo de genes que, aún no teniendo un impacto directo sobre la viabilidad celular en caso de mutación, su supresión conlleva a un incremento mutacional. Son aquellos genes denominados “cuidadores” o “guardianes” que codifican a diferentes familias de proteínas encargadas de detectar y reparar errores en el ADN, evitando así su fijación. A pesar de que la pérdida funcional de los genes cuidadores no implica de forma directa una ventaja para la proliferación celular, sí predispone a la pérdida de supresores tumorales o a la transformación oncogénica, facilitando así la transformación tumoral. Cabe destacar que estos 140 genes portadores de mutaciones

## INTRODUCCIÓN

conductoras, además de representar una muy pequeña fracción del total de genes conocidos, se concentran dentro de doce vías de señalización que realizan tres funciones específicas: regular la supervivencia de las células, controlar el correcto mantenimiento del ADN y determinar el destino celular.

### 1.4. Regulación molecular

La constante regeneración celular en el colon se encuentra precisamente regulada mediante de una compleja vía molecular denominada vía Wnt que engloba a su vez tres diferentes subvías siendo la más importante la vía canónica de Wnt o Wnt- $\beta$ -catenina (Figura 3). Las células del estroma localizadas en la zona basal de la cripta de Lieberkühn secretan la glicoproteína Wnt a la matriz extracelular, cuya consecuencia final es la potenciación de la proliferación celular. En este proceso interviene una molécula clave; la  $\beta$ -catenina. En ausencia del factor Wnt, la  $\beta$ -catenina se encuentra unida de manera natural a un complejo multimérico constituido por moléculas APC y axina. Las quinasas CKI y GSK3 $\beta$  reconocen este complejo y fosforilan la  $\beta$ -catenina. Esto conduce a su ubiquitinación y posterior destrucción en el proteosoma. En presencia del factor Wnt, se une a los receptores de membrana Frizzled/LRP produciendo el secuestro en la membrana celular de algunos de los componentes del complejo que recluta a la  $\beta$ -catenina evitando su fosforilación y destrucción. Esto favorece la acumulación de la  $\beta$ -catenina en el citoplasma, la cual accede al núcleo celular, activando los factores de transcripción de la familia TCF/LEF (factor de células T/potenciador linfoide) translocándose al núcleo, donde impulsará la transcripción de múltiples genes con sitios de unión ADN-TCF implicados en el crecimiento y la invasión tumoral.



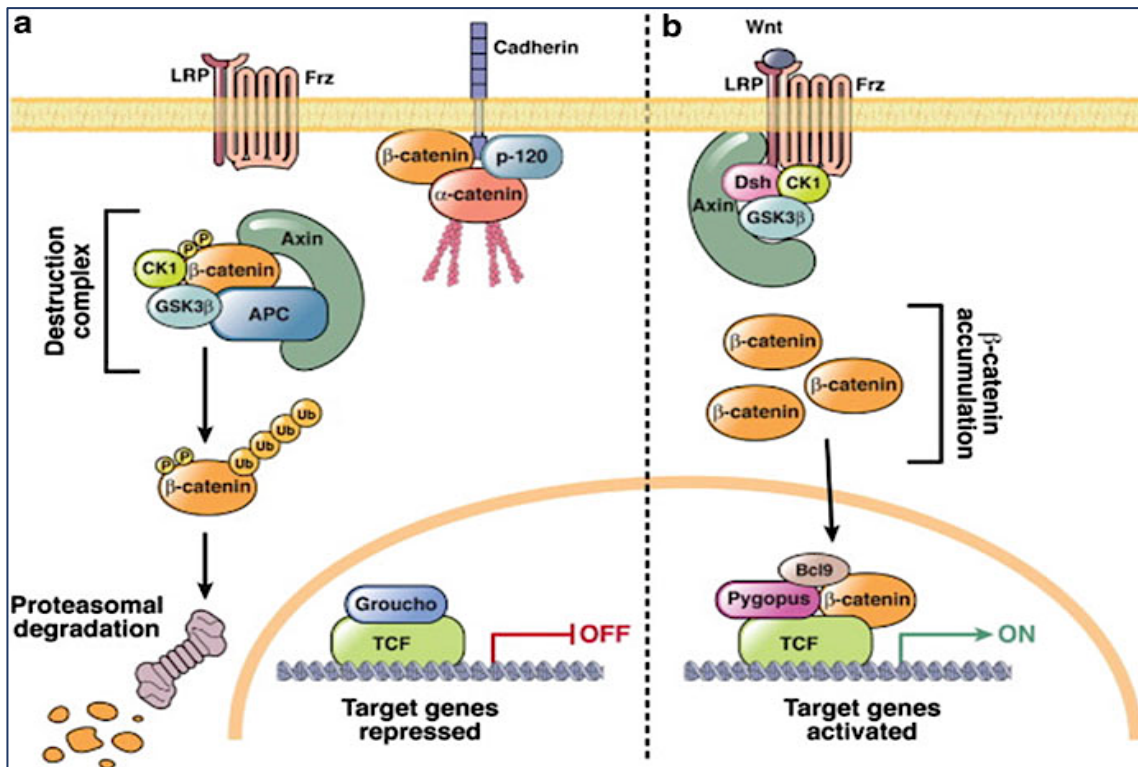


Figura 3. Representación de los estados inactivado (A) y activado (B) de la vía canónica de Wnt.

## 2. Cáncer Colorrectal

### 2.1. Epidemiología

#### 2.1.1. Incidencia

En 2017, en los Estados Unidos (EE.UU.) se calcularon 95,520 y 39,910 casos nuevos diagnosticados de cáncer de colon y de recto respectivamente(8). Ocupa el tercer lugar en frecuencia entre las neoplasias malignas, con una incidencia anual en hombres del 25% y del 15,85% en mujeres. Si bien el número de casos en cáncer de colon son similares entre ambos géneros, en cáncer de recto el riesgo es 1.5 más alto en hombres (23,720) que en mujeres (16,190). La incidencia del CCR presentó un aumento desde 1975 hasta mediados de la década de 1980, desde entonces se ha evidenciado una disminución gradual, atribuida a un mayor control de los factores de riesgo(9). De igual manera, el descenso anual del 2% durante la década del 2000 al 3% anual entre los años 2004 y 2013 podrían ser reflejo de la detección y eliminación de pólipos potencialmente malignos mediante colonoscopia como resultado de una mayor aceptación y adopción de las guías

## INTRODUCCIÓN

de cribado. En los últimos 45 años, la incidencia global del CCR no ha presentado grandes modificaciones, aunque si ha presentado variaciones entre sexo, edad, y raza. Aproximadamente un 4,6% de hombres (1 de cada 22) y un 4.2% de mujeres (1 de cada 24) serán diagnosticados de CCR a lo largo de su vida(8). Las tasas de incidencia son 30% más altas en hombres que en mujeres, aunque que las tasas de mortalidad son aproximadamente 40% más altas en varones (Figura 4). Las razones de la disparidad por género no son claras, pero reflejan en parte las diferencias a las exposiciones de factores de riesgo (por ejemplo, el tabaquismo) y las hormonas sexuales(10). La evidencia sobre la relación entre los estrógenos y la CCR no es concluyente. Aunque un estudio reciente haya establecido que los niveles más altos de estrógeno entre las mujeres posmenopáusicas se asocian con un menor riesgo(11), otros estudios lo relacionan a un mayor riesgo(12) o no establecen asociación alguna con el CCR(13).

El riesgo aumenta con la edad, la mediana de edad en el diagnóstico de cáncer de colon es 68 años en los hombres y 72 años en las mujeres, en cáncer de recto la mediana es de 63 años, tanto en hombres como en mujeres. Como resultado del aumento de las tasas de incidencia en grupos más jóvenes que coinciden con la disminución de las tasas en los grupos de mayor edad, la proporción de casos diagnosticados en personas menores de 50 años aumentó de 6% en 1990 hasta un 11% en 2013, la mayoría de estos casos (72%) ocurrieron en personas menores de 40 años. Se desconocen las razones del aumento en la incidencia en grupos más jóvenes, pero pueden ser reflejo del predominio del estilo de vida sedentario y a una mayor prevalencia de obesidad y/o patrones dietéticos desfavorables en niños y adultos jóvenes(14)

En cuanto al grupo étnico, hasta mediados de los años ochenta la incidencia del CCR entre la raza caucásica y en la raza negra fue equiparable, pero posteriormente, las tasas disminuyeron sólo en caucásicos, creando una brecha racial que aumentó hasta mediados de la década del 2000. Sin embargo, las tasas de incidencia global siguen un patrón descendente para todos los grupos étnicos (Figura 5). Las razones de las disparidades raciales/étnicas en el CCR son complejas, pero reflejan en gran medida las diferencias de la situación socioeconómica y una combinación entre la accesibilidad y la mayor utilización de las pruebas de cribado en la raza caucásica, así como las diferencias en la prevalencia de factores de riesgo(15)(Figura 6). Las personas con menos alcance a la educación (utilizada para estimar el estatus socioeconómico) son un 40% más propensos a ser diagnosticados de CCR que los que tienen un mayor nivel educacional(16). Cerca de la mitad (44%) de la disparidad socioeconómica se atribuye a diferencias en la

prevalencia de factores de riesgo asociados con el CCR (por ejemplo, el tabaquismo y la obesidad)(17). Es importante reconocer que los amplios grupos raciales y étnicos a los que generalmente se limitan las estadísticas sobre el cáncer representan poblaciones muy heterogéneas, dentro de las cuales la carga del CCR varía enormemente. Por ejemplo, el CCR ha sido el cáncer más comúnmente diagnosticado entre los nativos de Alaska desde principios de los años setenta por razones que son inciertas, aunque puede estar influenciado por una mayor prevalencia de factores de riesgo, como una dieta alta en grasa animal y baja en frutas y verduras, deficiencia de vitamina D, tabaquismo, obesidad y diabetes(18, 19). Por otro lado, los nativos residentes rurales en Alaska, tienen una alta prevalencia de *Helicobacter pylori*(20), una bacteria asociada con la inflamación y el cáncer gástrico, pero que también podría estar asociado al CCR(21).

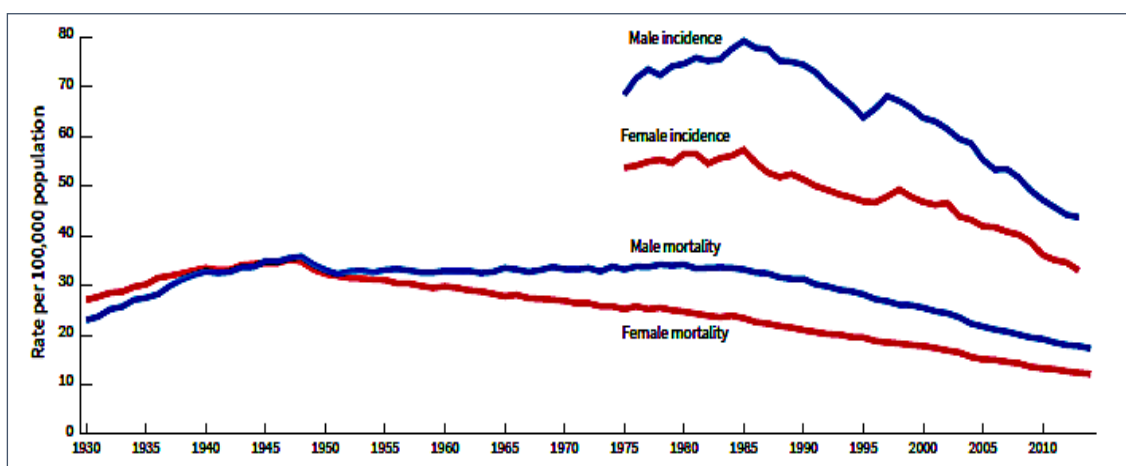


Figura 4. Tendencias en la incidencia de cáncer colorrectal (1975-2013) y tasas de mortalidad (1930-2014) por sexo, EE. UU. Sociedad Americana de Cáncer 2017. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019

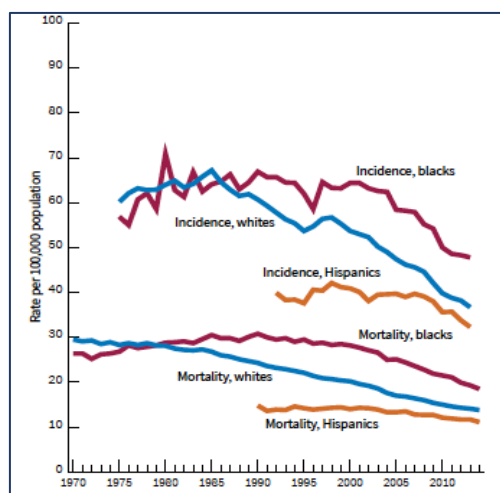


Figura 5. Tendencias en la incidencia de cáncer colorrectal (1975-2013) y tasas de mortalidad (1970-2014) por raza/etnia, EE. UU. Sociedad Americana de Cáncer 2017. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019

## INTRODUCCIÓN

### 2.1.2. Mortalidad

Actualmente no se cuentan con estudios estadísticos fiables sobre mortalidad por cáncer de colon y recto de forma individualizada debido a que casi el 40% de las muertes por cáncer de recto se describen de forma errónea como cáncer de colon(22).

Las tasas de mortalidad por CCR han ido disminuyendo desde 1980 en los hombres y desde 1947 en las mujeres, aunque la tendencia en las últimas tres décadas es muy similar en ambos sexos. La disminución de la mortalidad entre 1975 y 2000 se atribuye a mejoras en el tratamiento (12%), cambios en los patrones de riesgo (35%) y a la detección precoz (53%). Entre 2005 y 2014, las tasas disminuyeron en un promedio de 2,5% por año, tanto en hombres como en mujeres, en comparación con la disminución de alrededor del 2% anual durante los años noventa. Al igual que en las tasas de incidencia, las tasas de mortalidad por CCR en adultos menores de 50 años aumentó en alrededor de 1% por año desde 2005 hasta 2014. Esta tendencia contrasta con los grupos de edad avanzada, donde las tasas de mortalidad han ido disminuyendo en alrededor del 1% por año en individuos de 50 a 64 años y en un 3% por año en individuos de 65 años o más.

Por otro lado, las tasas de mortalidad en la raza caucásica empezaron a disminuir lentamente a principios de los años setenta, acelerándose paulatinamente a partir de entonces. Por el contrario, la mortalidad en la raza negra aumentó desde principios de 1970 hasta 1990, disminuyeron lentamente durante esta década y posteriormente equilibraron el ritmo de la disminución con la raza caucásica durante la década del 2000 (Figura 5). Aproximadamente la mitad de la disparidad racial se atribuye a una combinación de la realización de menos pruebas de detección precoz y menores tasas de supervivencia específica en la raza negra.

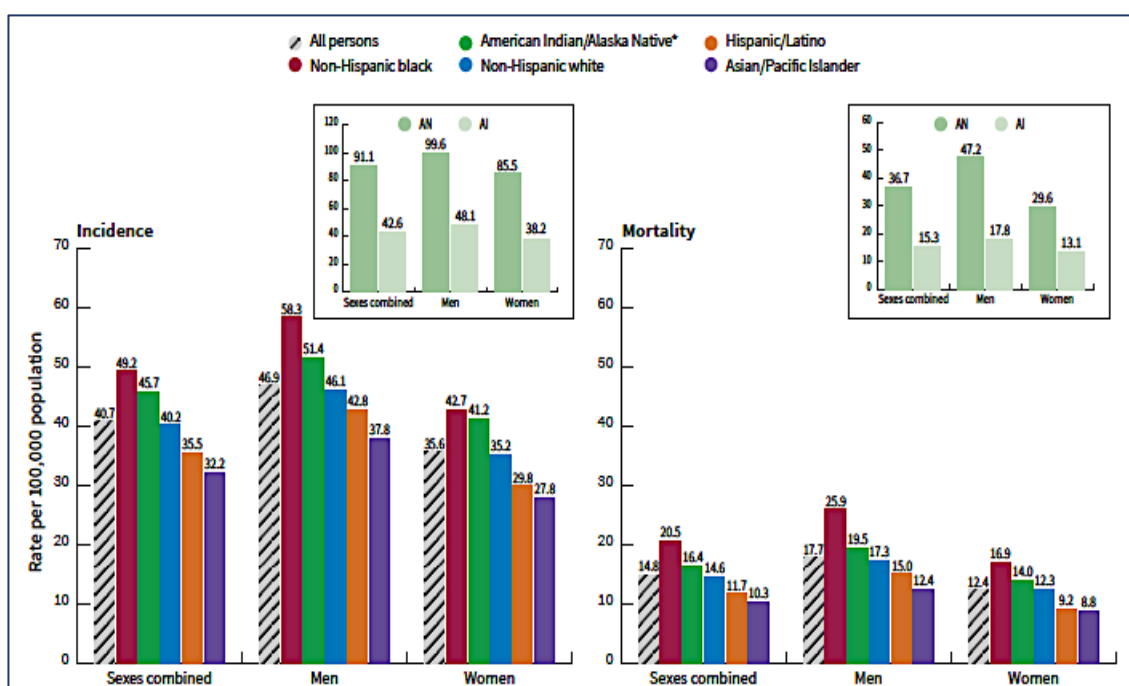


Figura 6. Tasa de incidencia de cáncer colorrectal (2009-2013) y mortalidad (2010-2014) por raza/etnia y sexo, EE. UU. Sociedad Americana de Cáncer 2017. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019.

### 2.1.3. Supervivencia

La tasa relativa de SG en el CCR es del 65% y del 58% a los 5 y 10 años posteriores al diagnóstico, respectivamente. Sólo el 39% de los pacientes son diagnosticados en estadio precoz, en los cuales la tasa relativa de supervivencia a los 5 años es del 90%. Si el CCR se ha extendido a los órganos vecinos o a los ganglios linfáticos, la tasa relativa de supervivencia a los 5 años disminuye al 65%, mientras que, si se trata de una enfermedad diseminada, generando metástasis hepáticas o pulmonares, la supervivencia a los 5 años se reduce al 9%. El cáncer de recto se diagnostica en etapas iniciales con mayor frecuencia que el cáncer de colon, 43% frente a un 38%, probablemente debido a la aparición temprana de los síntomas. La SG a los 5 años es de un 2% ligeramente superior en el cáncer de recto comparado con el cáncer de colon. Las disparidades en la supervivencia del CCR se deben en gran parte a las desigualdades socioeconómicas que dan lugar a diferencias en el acceso a las pruebas de detección temprana y al acceso de un tratamiento oportuno y de alta calidad(9, 23, 24). Aunque las diferencias en el tratamiento pueden desempeñar un papel menor, hay evidencia convincente de que los pacientes de raza negra tienen menos probabilidades de recibir un tratamiento quirúrgico y adyuvante óptimos

## INTRODUCCIÓN

(incluido el tratamiento mediante radiación)(25). Sin embargo, incluso cuando el tratamiento es óptimo y completo y a pesar de obtener la misma respuesta terapéutica, la supervivencia es menor en los pacientes de raza negra en comparación con los de raza caucásica(25, 26).

De acuerdo con la base de datos del Instituto Nacional del Cáncer, la tasa de supervivencia relativa a los cinco años en el cáncer de colon aumentó a un 66% durante el periodo 2006-2012, del mismo modo, dicho aumento se observó en el cáncer de recto llegando hasta un 68%. Por otro lado, se ha evidenciado una sorprendente mejora en la supervivencia a 5 años de la enfermedad en etapas avanzadas durante las últimas dos décadas, del 7% en 1987-1989 al 14% durante 2006-2012 en el cáncer de colon y del 4% al 12% en el cáncer de recto (Figura 7). Dichos aumentos se deben a las mejoras en técnicas de abordaje quirúrgico y al tratamiento sistémico adyuvante(27-29). Sin embargo, el aumento de la supervivencia en la enfermedad metastásica se limita a pacientes menores de 65 años(30), por lo que podría ser necesario una mayor distribución y un aumento en el nivel de alcance de la asistencia sanitaria para lograr un tratamiento óptimo a las poblaciones de mayor edad.

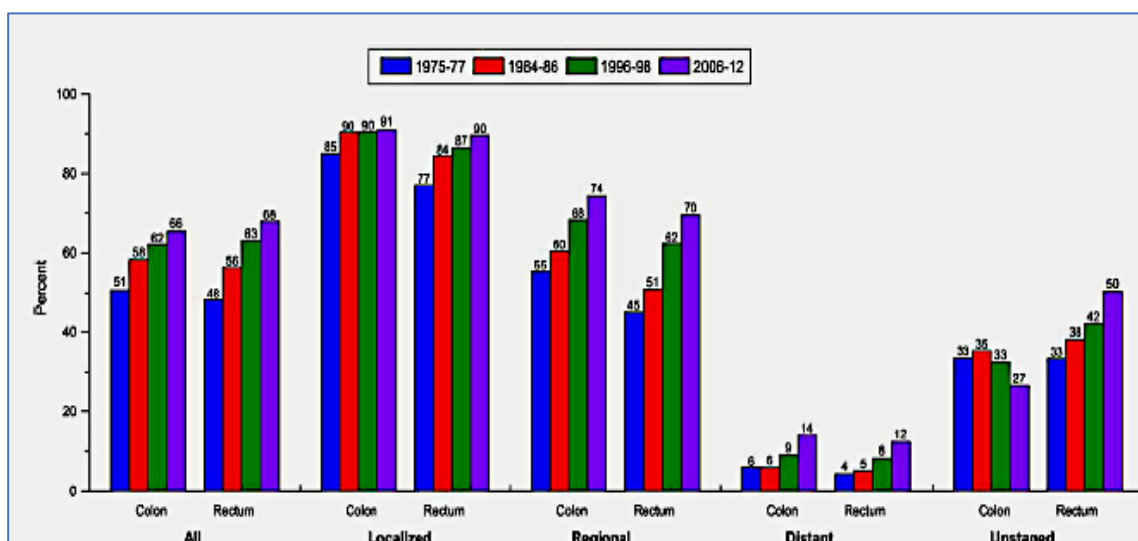


Figura 7. Tendencias en las tasas de supervivencia relativa a 5 años para el cáncer colorrectal por estadio y localización, Estados Unidos, 1975- 2012. Todos los pacientes fueron seguidos hasta 2013. Programa SEER, registros SEER 9, 2016.

### 2.2. Factores Etiológicos

Además de la edad avanzada y el grupo étnico, existen algunos factores de riesgo conocidos para el CCR que involucran comportamientos tradicionalmente asociados a países económicamente desarrollados como un estilo de vida sedentario, una dieta occidental representada como una baja ingesta de verduras y frutas y alto consumo de grasas y carne procesada de origen animal y el tabaquismo(31). La prevalencia de estos factores se refleja en la variación sustancial de la incidencia del CCR en todo el mundo, que es más alta en Europa y América del Norte y más baja en el África subsahariana. La relación entre el CCR y un estilo de vida occidental es tan fuerte que el aumento global de las tasas de enfermedad se consideran un marcador de la transición económica(32). Las personas que viven en países de ingresos económicos altos pero que tienen un estilo de vida saludable tienen menor riesgo de CCR que la población general. Un estudio reciente concluyó que mantener un peso saludable, ser físicamente activo, limitar el consumo de alcohol y consumir una dieta balanceada reducían el riesgo de CCR en más de un 37%(33). Los factores de riesgo no modificables están relacionados con los antecedentes personales y/o familiares, incluyendo una historia personal o familiar de CCR o de pólipos adenomatosos y una historia personal de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) durante un largo período de tiempo.

#### 2.2.1. Factores genéticos

##### 2.2.1.1. Herencia y agregación familiar

Más de dos tercios de los casos de CCR se dan en familias donde no existen antecedentes familiares de dicha enfermedad: A estos casos se les denomina CCR esporádicos. En este grupo, a la influencia de los factores genéticos se le atribuye un peso menor, mientras que es al efecto ambiental al que se asocia con la causa del CCR. El CCR familiar implica la existencia de dos o más afectos en el núcleo familiar y suele ir ligado a la presencia de variantes que aportan un riesgo sustancial a desarrollar este tipo de cáncer. Hasta el 30% de los pacientes con CCR presentan antecedentes familiares de la enfermedad lo suficientemente importantes como para constituir una agregación familiar (riesgo medio), de los cuales aproximadamente el 8% se deba a un patrón genético hereditario conocido como de alta penetrancia (riesgo alto)(34). Es decir, únicamente alrededor de un quinto

## INTRODUCCIÓN

de los casos de CCR familiar tienen una causa genética conocida. La fracción restante podría estar explicada en base a variantes de alta penetrancia todavía no identificadas, la acumulación de variantes de bajo y moderado riesgo, la influencia de factores ambientales y/o el azar, o la combinación de los factores anteriores. Por otro lado, la existencia de multitud de variantes que aportan variables incrementos de susceptibilidad al CCR hace que la frontera entre los tipos esporádico y familiar no pueda ser bien establecida desde el punto de vista genético.

Las personas con un familiar en primer grado (padre, hermano o hijo) con diagnóstico de CCR presentan el doble de riesgo de desarrollar la enfermedad en comparación con personas sin este antecedente familiar y depende casi siempre de la edad del pariente en el momento del diagnóstico y el número de familiares afectados, por ejemplo, si se trata de dos familiares de primer grado o si uno de los casos se ha presentado antes de los 40 años el riesgo aumenta hasta cinco veces sobre el riesgo basal(35, 36) (Tabla 1). El riesgo puede llegar hasta el 50% para las personas con múltiples familiares de primer grado diagnosticados de CCR, incluso algunos estudios recientes indican que el riesgo de enfermedad de forma hereditaria podría extenderse más allá de los familiares de primer grado(37). El riesgo también aumenta ligeramente entre las personas con un familiar de primer o segundo grado diagnosticado de adenomas colorrectales(38). El conocimiento sobre el CCR por agregación familiar ha aumentado sustancialmente en los últimos años, se cree que gran parte de los casos se deba a la interacción entre factores de riesgo modificables y el efecto acumulativo de variaciones genéticas relativamente comunes que aumentan el riesgo de enfermedad(39), a diferencia de los síndromes hereditarios que representan aproximadamente el 5% de todos los casos de CCR y están asociados con mutaciones genéticas específicas(34).



Tabla 1. Historia familiar y riesgo de desarrollar CCR. Colorectal Cancer Facts &amp; Figures 2017-2019.

HISTORIA FAMILIAR		RIESGO (%)
FAMILIAR	Un familiar de 1 <sup>er</sup> grado	6
	Un familiar de 1 <sup>er</sup> grado y dos de 2 <sup>do</sup> grado	8
	Un familiar de 1 <sup>er</sup> grado menor de 45 años	8
HEREDITARIO	Dos familiares de 1 <sup>er</sup> grado	17
	Portador de mutación CCHNP	70
	Portador de mutación PAF	100

- **Cáncer de Colon Hereditario no Polipósico**

El síndrome hereditario más frecuente es el cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP) o síndrome de Lynch, el cual se hereda de forma autosómica dominante y representa aproximadamente el 2% al 4% de todos los casos de CCR. Esta enfermedad esta causada por mutaciones en un grupo de genes llamados *missmatch repair* (MMR), que son el MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, los cuales intervienen en la reparación de los daños producidos en el ácido desoxirribonucleico (ADN) celular. Las personas diagnosticadas de CCHNP tienen un mayor riesgo de desarrollar una amplia variedad de otros tipos de cánceres incluyendo el carcinoma de endometrio, ovario, intestino delgado y estómago(40). Entre las personas con síndrome de Lynch, se estima que en un 18% de los hombres y en un 19% de las mujeres, la edad media de diagnóstico del CCR es de 45 a 50 años(41).

- **Poliposis Adenomatosa familiar**

La poliposis adenomatosa familiar (PAF) es una enfermedad autosómica dominante y es el segundo síndrome hereditario más frecuente, representando menos del 1% de todos los casos de CCR. Se caracteriza por el desarrollo de adenomas distribuidos en colon y recto (de 100 a 1000) a partir de los 10 a 12 años de edad(42). La PAF se puede asociar a manifestaciones clínicas en otras localizaciones, como tumores desmoides, tumores duodenales, pólipos gástricos, carcinoma de tiroides e hipertrofia congénita del epitelio

## INTRODUCCIÓN

pigmentario de la retina. En el 80% de los casos está causada por mutaciones en el gen *Adenomatous Polyposis Coli (APC)* localizado en el cromosoma 5q21, estas mutaciones suelen heredarse, aunque también pueden ocurrir de forma espontánea, por lo que las personas afectadas con este síndrome no siempre tienen antecedentes familiares de PAF. La cirugía es el método estándar de prevención en el desarrollo del CCR en las personas con este diagnóstico. Sin intervención, el riesgo se aproxima al 100% alrededor de los 40 años de edad(43).

La PAF atenuada (PAFA) es una forma menos grave de la enfermedad con una edad de inicio más tardía y en la que se desarrollan menos números de pólipos (de 10 a 100), de características más sésiles, localizadas predominantemente en el colon derecho respetando en la mayoría de los casos el área del recto(44).

- **Poliposis Asociada a MUTYH**

Es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones bialélicas del gen MUTYH(45). La mayoría de las personas con poliposis asociada al gen MUTYH (PAM) desarrollan características clínicas y un número de pólipos similares a la PAFA (de 20 a 100), aunque se han descrito familias que han mostrado hasta 500 pólipos predominantemente en colon derecho. Las características clínicas de este síndrome genético están menos definidas, por ejemplo, algunos pacientes con diagnóstico de PAM no presentan pólipos colorrectales(46). Pueden presentar pólipos gastroduodenales, quistes dentales, quistes sebáceos y un aumento de la incidencia de cáncer de mama. La edad de presentación se sitúa alrededor de los 45 años.

Existe un gran interés por desarrollar métodos de diagnóstico en individuos y grupos familiares de alto riesgo por el gran beneficio demostrado en la prevención y la detección precoz del CCR y por la disminución del riesgo de aparición de otras neoplasias asociadas(47). Actualmente, sólo alrededor del 1% de los casi 800.000 pacientes con síndrome de Lynch son conscientes de su enfermedad, debido a que el diagnóstico genético no suele realizarse hasta después de la aparición de algún tipo de cáncer(48). Aunque algunos grupos de estudio han recomendado la realización de pruebas genéticas para el síndrome de Lynch en todos los pacientes con CCR, ni este enfoque ni el cribado de la población general es rentable debido a la rareza de la enfermedad(49).

Actualmente, el registro de los antecedentes familiares incluido en los **criterios de Ámsterdam II** (Tabla 2) y/o los **criterios de Bethesda revisados** (Tabla 3) continúa siendo la estrategia más importante para identificar los grupos familiares con síndromes de CCR hereditario. Hoy en día, cerca de la mitad de las historias clínicas en atención primaria carecen de información sobre los antecedentes familiares(50, 51). Un estudio dirigido a la revisión de historias clínicas de pacientes con CCR demostró que sólo el 22% tenían una información completa y detallada sobre los antecedentes familiares, la cual es necesaria para identificar a las personas a las que se les debe ofrecer estudio genético y/o orientación sobre pruebas de cribado(52). Este reconocimiento de individuos de alto riesgo permite realizar una vigilancia estrecha y selectiva, la cual podría lograr una reducción en un 50% de la incidencia y mortalidad por CCR en personas con síndrome de Lynch(53). Por otro lado, debido a que la eliminación de pólipos no previene todos los tipos de neoplasias en este síndrome, se hace cada vez más hincapié en la utilidad de la quimioprevención, como el uso de fármacos antiinflamatorios(42). Aunque actualmente no hay medicamentos aprobados para la prevención del CCR en poblaciones de alto riesgo, se ha propuesto que el tratamiento con aspirina podría disminuir sustancialmente el riesgo en personas con síndrome de Lynch.

## INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Nuevos criterios clínicos para el CCHNP propuesto por un grupo de colaboración internacional(54).

CRITERIOS DE AMSTERDAM II (1998)
<b>3 o más familiares con un cáncer asociado (CCR, cáncer de endometrio, de intestino delgado, uréter o pelvis renal). Uno de ellos debe ser un familiar de 1<sup>er</sup> grado de los otros dos.</b>
<b>Los tumores deben ser confirmados mediante estudio anatomopatológico</b>
<b>Debe excluirse el diagnóstico de PAF</b>
<b>2 o más generaciones afectadas</b>
<b>1 o más familiares diagnosticados antes de los 50 años</b>

Tabla 3. Pautas revisadas de Bethesda para el CCHNP y la inestabilidad de microsatélites(55).

CRITERIOS DE BETHESDA REVISADOS (2003)
<b>CCR diagnosticado en un paciente de menos de 50 años.</b>
<b>Presencia de CCR sincrónico o metacrónico u otro tumor asociado a síndrome de Lynch, independientemente de la edad.</b>
<b>CCR con histología de inestabilidad de microsatélites alta, diagnosticada en un paciente menor de 60 años.</b>
<b>CCR diagnosticado en uno o más familiares de 1<sup>er</sup> grado con un tumor asociado a síndrome de Lynch, diagnosticado antes de los 50 años.</b>
<b>CCR diagnosticado en dos o más familiares de 1<sup>er</sup> grado o de 2<sup>do</sup> grado con un tumor asociado al síndrome de Lynch, independientemente de la edad.</b>

### 2.2.2. Factores Clínicos

Las personas con antecedentes de CCR son más propensas a desarrollar un nuevo carcinoma, especialmente cuando el diagnóstico del primer episodio se realizó a una edad temprana. Una historia de pólipos adenomatosos también aumenta el riesgo, especialmente si son múltiples(56). Estudios observacionales han establecido una mayor incidencia de CCR en pacientes con diagnósticos previos de otras neoplasias malignas, especialmente en mujeres que han presentado cáncer de mama, ovario y/o endometrio.

- **Pólipos Colorrectales**

Los pólipos únicos o múltiples pueden ser de origen adquirido o hereditario y en la gran mayoría presentan características benignas. Los pólipos adenomatosos, pólipos serrados y quizás los pólipos hiperplásicos (fundamentalmente los proximales si son numerosos o de gran tamaño) tiene un riesgo aumentado de transformación maligna. El tiempo necesario para que un adenoma desarrolle características malignas oscila entre 7 y 10 años, dicho periodo puede acortarse en los pólipos pediculados, con tamaño  $\geq 10$  mm y con una histología vellosa y/o de displasia severa.

Actualmente, el tamaño es el predictor de malignidad más sencillo y práctico. Los pólipos  $< 6$  mm tienen un riesgo prácticamente nulo de desarrollar CCR, los pólipos entre 10 y 20 mm de diámetro tienen un riesgo del 5%, mientras que en los pólipos  $> 2$  cm de diámetro el riesgo puede llegar a superar el 10%. En relación con los datos macroscópicos, más del 50% de los pólipos sésiles tienen un alto riesgo de malignidad, en comparación con el 10% de riesgo existente en los pediculados. Los pólipos en los que predomina la arquitectura vellosa tienen más probabilidad de transformación maligna que los de morfología tubular. De igual manera, cuanto mayor grado de displasia epitelial, mayor es la posibilidad de malignización.

- **Enfermedad inflamatoria intestinal**

Las formas más comunes de EII, son la Colitis Ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). Es más frecuente en países desarrollados y en personas de raza caucásica. Las personas diagnosticadas de EII adquieren casi el doble de riesgo de desarrollar CCR en comparación con la población general. El riesgo aumenta en gran medida de acuerdo con el alcance, la duración y la gravedad de la enfermedad(57, 58). El riesgo en la CU es relativamente bajo durante los diez primeros años, posteriormente aumenta a razón de 0,5% a 1% por año, de manera que las tasas acumuladas del riesgo para CCR en estos pacientes varían entre el 8% y el 30% a los 25 años. El riesgo es mayor en aquellos pacientes diagnosticados en edades tempranas, con compromiso extenso del marco cólico (pancolitis), episodios clínicos graves, presencia de colangitis esclerosante primaria (CEP), antecedentes de trasplante hepático, historia de CCR en familiares de 1er grado y con evolución de la enfermedad de más de 10 años. El riesgo de degeneración maligna en la EC está aumentado en pacientes con lesiones displásicas y de larga duración, aunque dicho riesgo es inferior en comparación con la CU. Sin embargo, en los últimos años el riesgo de CCR, tanto en la CU y en la EC, ha ido disminuyendo debido al mayor uso de

## INTRODUCCIÓN

medicamentos específicos dirigido a controlar la inflamación y al manejo adecuado de pacientes con biopsias colorrectales sugestivas de displasia(59).

- **Diabetes Mellitus tipo 2**

Las personas diagnosticadas de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) tienen un riesgo del 30% al 40% de desarrollar CCR(60) y una tasas de mortalidad elevadas. Aunque la DM2 y el CCR comparten muchos factores de riesgo, incluyendo la obesidad y un estilo de vida sedentario, este riesgo permanece incluso después de aumentar la actividad física y de disminuir el índice de masa corporal (IMC) y el índice circunferencia/cintura (ICC)(61). Existen algunas teorías que sugieren que el estado de hiperinsulinemia incrementa el riesgo de CCR en un 21%(62). Algunos estudios señalan que el tratamiento crónico con insulina en pacientes con DM2 triplican el riesgo en comparación con los pacientes que no reciben insulina como tratamiento(63). Sin embargo, actualmente se sugiere que la metformina, un fármaco administrado por vía oral en la DM2 para disminuir los niveles de glucemia, podría lograr de forma independiente, una reducción de riesgo(64). Por otro lado, se ha demostrado que cuando coexisten los dos diagnósticos las tasas de supervivencia disminuyen y es más frecuente el desarrollo de tumores de localización distal, los cuales tienen una mayor morbilidad en comparación con los tumores proximales(65)

### 2.2.3. Factores conductuales

#### 2.2.3.1. Estilos de vida y hábitos tóxicos

- **Actividad Física**

La actividad física está asociada a una disminución del riesgo de cáncer de colon, sin embargo, dicha asociación no ha sido concluyente en cáncer de recto. Algunos estudios demuestran que las personas físicamente activas tienen un 25% menos de riesgo de desarrollar tumores proximales si se compara con personas con menos actividad física(66, 67). Además, las personas que practican ejercicio físico de forma habitual previo al diagnóstico de CCR tienen una menor índice de mortalidad que aquellos sin una actividad física regular(68). En un metaanálisis se concluyó que las personas con un estilo de vida más sedentaria (por ejemplo, pasar la mayor parte de las horas del día viendo la televisión) tienen un aumento del 25% al 50% de riesgo de padecer cáncer de colon en comparación

con las personas menos sedentarias(69). Inclusive las personas sedentarias que cambian su estilo de vida con un hábito de ejercicio físico regular pueden llegar a reducir dicho riesgo(70).

- **Sobrepeso y Obesidad**

El exceso de peso corporal (EPC) aumenta el riesgo de CCR, con una asociación más clara en hombres que en mujeres y para el cáncer de colon que para tumores rectales. Específicamente, en comparación con las personas con un peso normal (IMC= 18,5-24,9), los hombres obesos tienen un 50% más de riesgo para el cáncer de colon y un 20% más para el cáncer de recto, mientras que las mujeres obesas tienen un 20% y un 10% más de riesgo de cáncer de colon y para el cáncer de recto respectivamente(71). El exceso de riesgo conferido por la obesidad es independiente de la actividad física(72).

La obesidad abdominal, medida por el ICC, tiene un mayor riesgo en comparación con el exceso de grasa en muslos o caderas(71). La combinación IMC/ICC puede ser un indicador más preciso de exceso de riesgo que cualquiera de las dos medidas por separadas(73). El EPC parece tener una mayor influencia en el riesgo del CCR cuando se diagnostica en edades precoces si lo comparamos con individuos de edades más avanzadas(74). Además, puede tener un impacto negativo en el correcto funcionamiento de los procesos bioquímicos en el cuerpo produciendo el llamado Síndrome Metabólico, el cual podría estar relacionado con la incidencia y la supervivencia de CCR independientemente del grado de obesidad(75, 76).

- **Tabaquismo**

En noviembre de 2009, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer informó que hay pruebas suficientes para concluir que el tabaquismo podría ser una causa del CCR(77). El riesgo de desarrollar CCR aumenta en relación con el número de cigarrillos que se consume y al tiempo de exposición. La asociación parece estar más vinculada al cáncer de recto que al cáncer de colon y para algunos subtipos moleculares específicos(78, 79). Algunos estudios asocian la exposición del humo de tabaco con una menor supervivencia específica(80) sobre todo en los fumadores activos(81). Estos hallazgos sugieren un papel directo de la nicotina en la génesis de tumores colorrectales a partir de la estimulación de los receptores B-2 adrenérgicos.

## INTRODUCCIÓN

- **Alcoholismo**

El consumo moderado y excesivo de alcohol en comparación con el consumo ligero (<12,5 ml por día), se asocia con un mayor riesgo de CCR(82). Comparado con los no bebedores y los bebedores ocasionales, las personas que tienen un consumo diario promedio de 2 a 3 bebidas alcohólicas tienen un 20% más de riesgo de desarrollar CCR, y aquellos que consumen más de 3 bebidas diarias de alcohol tienen alrededor de un 40% más de riesgo(83). Esto es debido fundamentalmente a las alteraciones que causa el alcohol en el ácido fólico del organismo y a los posibles efectos de productos químicos como las nitrosaminas, cuya acción disolvente facilita la absorción de otros carcinógenos. La asociación entre el alcohol y el CCR es más frecuente en hombres que en mujeres, debido presumiblemente a las diferencias hormonales que tienen un efecto sobre el metabolismo del alcohol.

### **2.2.3.2. Dieta y consumo de medicamentos**

Las diferencias poblacionales en la incidencia del CCR a nivel mundial, así como los variaciones bruscas en los porcentajes del riesgo entre las poblaciones de inmigrantes, sugieren que la dieta guarda una estrecha relación con la aparición de lesiones potencialmente malignas(84). Los patrones dietéticos probablemente influyen de forma directa en el riesgo a través de elementos específicos de la dieta e indirectamente a través de la malnutrición y la obesidad. La dieta también tiene una gran influencia en el microbioma intestinal, donde las células bacterianas superan en número a las células huésped con una relación de 10:1(85). La composición de este entorno diverso desempeña un papel tanto positivo como negativo en el desarrollo de tumores a través de su influencia en la respuesta inmune y la inflamación(86, 87). El papel directo que desempeñan algunos alimentos específicos en la aparición del cáncer es de muy difícil estudio debido a la dificultad de definir y medir la ingesta a través de cuestionarios alimenticios, las diferencias en las fuentes constituyentes de la dieta (por ejemplo, granos de cereales, frutas, y las verduras contribuyen a la ingesta de fibra) y al fuerte vínculo entre los patrones dietéticos y otros comportamientos de la salud.



- **Productos lácteos y el Calcio**

Una gran cantidad de estudios indican que el consumo de calcio mediante suplementos y/o productos lácteos está asociado a un menor riesgo de desarrollar adenomas colorrectales y CCR(88). La ingesta de productos lácteos parece conferir un factor de protección debido a su alto contenido cálcico, logrando una reducción en la proliferación y promoviendo la diferenciación celular. Aunque, en algunos ensayos se ha relacionado con un menor riesgo de recurrencia de adenomas colorrectales(89), este factor de protección no parece potenciarse con un mayor consumo. Otros componentes derivados de la leche como la lactoferrina(90), las bacterias de productos lácteos fermentados(91) y la vitamina D han demostrado una acción protectora en el CCR(92). Es importante señalar que esta función protectora puede requerir años de seguimiento para aceptarse de forma definitiva(93).

- **Fibra**

En la década de 1970 ya se proponía la hipótesis de que la dieta rica en fibra reducía el riesgo de CCR, basado en las bajas tasas de incidencia observadas en una población rural con una dieta con altos niveles de fibra. Aunque es altamente probable que la fibra dietética disminuya el riesgo de CCR a través de varias propiedades, incluyendo una menor exposición a carcinógenos debido a un mayor volumen de las heces y a un tiempo reducido del tránsito intestinal, los resultados en estudios recientes siguen siendo inconclusos. Debido al beneficio global para la salud de una dieta rica en fibra, la Sociedad Americana del Cáncer y el Fondo Mundial para la Investigación del Cáncer recomiendan dietas ricas en granos enteros, frutas y verduras (flavonoides) para la prevención primaria del CCR(94).

- **Folato**

La ingesta de folato, consumido a través de la dieta o de suplementos, parece tener una función contradictoria en el riesgo del CCR, potenciando el crecimiento de tumores preexistentes y por el contrario inhibiendo la formación de nuevos tumores en el tejido sano(88). Se ha especulado que el aumento de los niveles de folato, como resultado de la fortificación de harina y cereales enriquecidos en 1998 fueron responsables del repunte inexplicable de las tasas de incidencia de la CCR a finales de la década de 1990(95). Sin embargo, esta hipótesis no está respaldada por un análisis reciente donde no se encontró una asociación entre la suplementación de ácido fólico y el riesgo de CCR en los primeros

## INTRODUCCIÓN

5 años de tratamiento(96). Los posibles efectos protectores parecen requerir un seguimiento de por lo menos unos 10 a 15 años(97).

- **Frutas y verduras**

Al igual que en la fibra, aunque se ha observado una relación inversa en el consumo de frutas y verduras con el riesgo de CCR en comparación con una ingesta elevada de carne roja procesada, los resultados de los estudios que evalúan específicamente esta asociación son inconsistentes(88). La ingesta de frutas y verduras está asociada con efectos beneficios sobre la salud en general, debido fundamentalmente al alto contenido de flavonoides, compuestos capaces de eliminar radicales libres y con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales. Sin embargo, cualquier efecto protector en el CCR parece ser leve cuando se compara con el bajo consumo, mientras que con un alto consumo no se observa un claro beneficio adicional(98).

- **Carne roja y procesada**

El consumo de carne roja procesada aumenta el riesgo de CCR(99). Las razones de esta asociación siguen siendo poco claras, pero pueden estar relacionadas con el alto contenido de grasa y la producción de carcinógenos como la N-nitrosamina(100). El mecanismo patogénico incluye además de la formación de compuestos N-nitrosos endógenos, la citotoxicidad celular que aumenta la tasa de mutaciones en el ADN del tejido colorrectal(101). Por todo ello, en 2015 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasificó a la carne roja como probablemente carcinógena y a la carne procesada como carcinógena en seres humanos(102).

- **Vitaminas**

Una gran mayoría de datos genéticos y moleculares sugieren que niveles sanguíneos altos de vitamina D pueden estar asociados con un menor riesgo de CCR, y que por el contrario los niveles bajos de esta vitamina pueden relacionarse con un alto riesgo de desarrollar esta neoplasia(103). Por otro lado, la vitamina B6 puede tener un efecto en la aparición de adenomas colorrectales y en la carcinogénesis del CCR esporádico mediado por variantes genéticas en el metabolismo del carbono(104). Es importante mencionar que estos resultados no se reflejan en estudios a largo plazo por lo que no son concluyentes(88).

- **Fármacos antiinflamatorios no esteroideos**

Existe una amplia evidencia de que el uso regular a largo plazo de la aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como los Coxibs (Rofecoxib y Celecoxib) puede establecer un efecto de quimioprevención(105) y por lo tanto reducir el riesgo de CCR(106, 107). Los consumidores habituales de aspirina e inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) que desarrollan CCR parecen presentar tumores menos agresivos y una mayor supervivencia en comparación con los no consumidores debido a la asociación de estos fármacos con la presencia de inestabilidad de microsatélites. Aunque la Sociedad Americana del Cáncer no ha realizado un estudio formal, actualmente no se recomienda el uso de estos fármacos para la prevención del CCR en la población general debido a los efectos secundarios potenciales de los COX-2 como la hemorragia gastrointestinal grave o parada cardíaca. Sin embargo, el Grupo de Trabajo en Servicios de Prevención de los EE. UU. actualmente recomienda una dosis baja de aspirina diaria para la prevención de enfermedades cardiovasculares y de CCR en individuos mayores de 50 años que tienen un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular.

- **Hormonas sexuales**

Aunque existe alguna evidencia que asocia a mujeres en tratamiento hormonal con un menor riesgo de CCR, esta asociación es inconsistente(108) debido a que muchos estudios de seguimiento a largo plazo no encuentran una asociación significativa(109). Las diferencias entre el subtipo de cáncer(110) y las fórmulas del fármaco pueden explicar en parte estas inconsistencias.

- **Otros fármacos**

Estudios recientes sugieren que los bisfosfonatos orales, utilizados en la prevención y tratamiento de la osteoporosis, podrían reducir el riesgo de CCR(111).

## INTRODUCCIÓN

### 2.3. Etiopatogenia

En los últimos años se ha evidenciado un progreso significativo en la identificación de los defectos genéticos específicos que subyacen a la mayoría de los casos del CCR. Para desarrollar estrategias efectivas de prevención, diagnóstico y tratamiento, es esencial comprender las vías y los eventos moleculares que impulsan a la carcinogénesis.

El CCR presenta tres patrones en su desarrollo: hereditario, familiar y/o esporádico. El **CCR hereditario** deriva de mutaciones celulares en la línea germinal, representa el 10% de todos los casos y presenta síndromes bien definidos de predisposición al carcinoma, como el CCHNP o síndrome de Lynch y la PAF. El **CCR familiar** representa el 25% de casos y se suelen presentar sin una etiología genética o patrones de herencia Mendeliana definidas. El **CCR esporádico** deriva de mutaciones celulares somáticas y representa aproximadamente el 70% de los casos sin una asociación de historia familiar conocida.

#### 2.3.1. Desarrollo morfológico

##### 2.3.1.1. Secuencia Pólipo-Carcinoma

Fue descrita por Muto en 1975. A consecuencia de un estudio, realizado en el Hospital St. Mark's de Londres, basado en un número importante de pólipos adenomatosos y CCR se pudo concluir que casi todos los casos se desarrollaban a partir de estas lesiones. Las pruebas a esta teoría incluyeron la evidencia de tejido adenomatoso benigno residual en tumores malignos, focos de tejido maligno en pólipos de mayor tamaño y pólipos de apariencia benigna que se desarrollaban a partir de un carcinoma invasivo. Sólo un pequeño número de pólipos progresó a carcinoma, teniendo el mayor riesgo de transformación maligna aquellos pólipos de más de 2 cm, con arquitectura vellosa o atipia epitelial severa. Sin embargo, el desarrollo desde la mucosa normal hasta el cáncer invasivo era lento, estimándose un tiempo promedio de 5 a 15 años(112). Los pólipos hiperplásicos no se incluyeron en el estudio ya que no se consideraban lesiones premalignas.

### 2.3.1.2. Secuencia Adenoma-Carcinoma

En 1987, se informó sobre la historia natural de pólipos no resecados mayores de 1 cm en 226 pacientes que rechazaron la extirpación quirúrgica(113). Con un seguimiento a 20 años, se concluyó que existía un 24% de riesgo de malignización en el sitio del pólipo no resecado y un 35% de riesgo de carcinoma en todo el marco cólico. En el *National Polyp Study* se confirmó la hipótesis de que el CCR se desarrollaba a partir de lesiones adenomatosas al mostrar que la polipectomía mediante colonoscopia reducía el riesgo de enfermedad(114) y posteriormente se observó que en individuos con síndromes predisponentes a la aparición de adenomas como la PAF desarrollaban invariablemente CCR en la tercera o cuarta década de la vida si no se les realizaba una colectomía profiláctica. En 1990, se propuso un modelo genético multivariante del CCR, cuyo punto de partida se desarrollaba con la inactivación del gen de supresión *APC* en la mucosa colónica normal, seguida de mutaciones activadoras en el gen *KRAS* y mutaciones adicionales posteriores(115) (Figura 8). Se establecieron entonces, tres principios “clave” de la llamada secuencia de adenoma carcinoma: los adenomas se desarrollan a partir de criptas aberrantes del epitelio colorrectal(116), la necesidad de múltiples alteraciones genéticas, y la existencia de intermediarios en la progresión de la carcinogénesis(117).

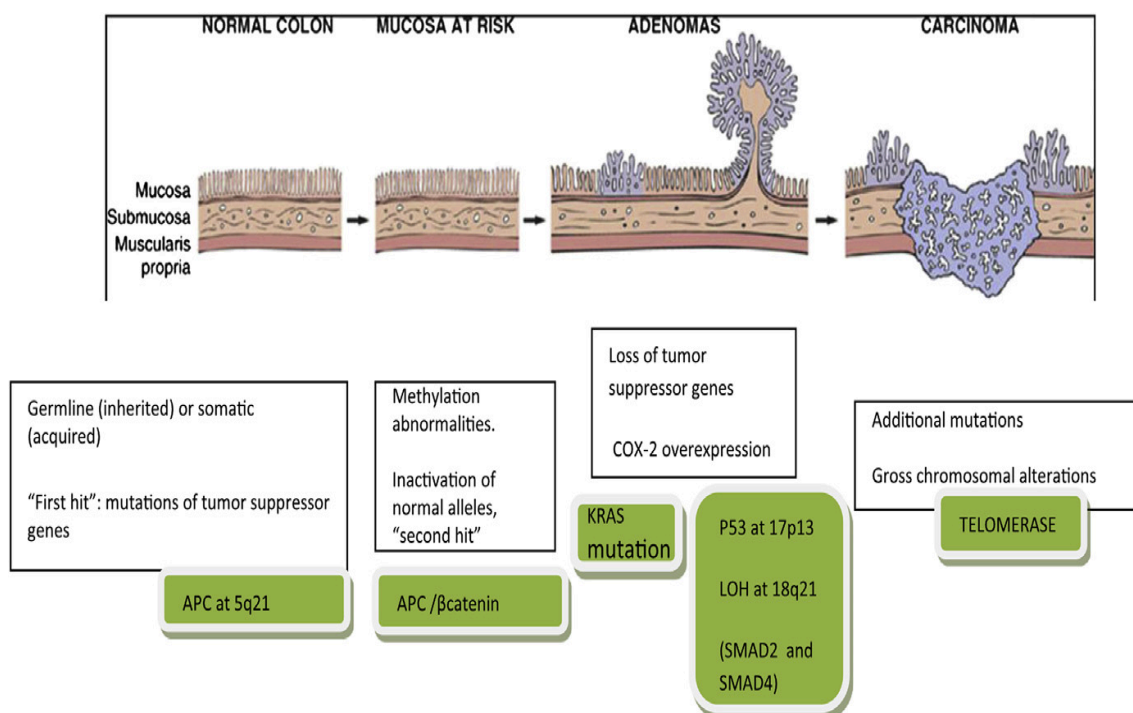


Figura 8. Secuencia de adenoma-carcinoma (104)

## INTRODUCCIÓN

- **Focos de criptas aberrantes**

Los focos de criptas aberrantes (FCA) en la mucosa colorrectal se describieron por primera vez como posibles lesiones preneoplásicas en 1984(118). Una cripta aberrante presenta una abertura luminal alterada, un revestimiento epitelial grueso y una mayor longitud en comparación con una cripta normal de la mucosa. En 1987, Bird demostró el aumento en número y tamaño de criptas aberrantes en el colon de ratones al exponerlos a un carcinógeno llamado azoximetano (AOM). La exposición repetida dio como resultado la formación de grupos de dos o más criptas aberrantes denominándolos FCA(119).

En 1998, se reconoció que los FCA eran precursores de lesiones adenomatosas y del CCR, aunque los estudios se basaron principalmente en piezas quirúrgicas de pacientes con un diagnóstico de CCR ya conocido. En un estudio que incluyó a 350 personas, Takayama utilizó la endoscopia de alta resolución para el estudio del número, tamaño y características displásicas de los FCA en sujetos sanos, con lesiones adenomatosas y con CCR(116). Tres de estos pacientes fueron examinados para detectar los FCA en todo el marco cólico incluyendo el recto. Casi el 80% (9/11) de los FCA detectados se localizaron en la región rectosigmoidea. En los tres pacientes con estudio completo se observó al menos una lesión en esta zona. Takayama señaló que el número y el tamaño de los FCA aumentaban con la edad y que estas características tenían una asociación positiva con la presencia de displasia y el número de adenomas. El 5% de los FCA fueron displásicos. Tras el tratamiento con un AINE específico, se observó una disminución significativa en el número de FCA, lo cual indicaba que se trataba de un cambio morfológico dinámico reversible. La mutación *KRAS* en el codon 12 se evidenció en el 80-90% y en el 60% de los FCA hiperplásicos y displásicos respectivamente, lo que sugiere la existencia de diferentes mutaciones genéticas involucradas en la formación de los FCA displásicos.

En una revisión reciente, el papel de los FCA en la carcinogénesis queda establecida y se refuerza en base a los cambios moleculares comunes observados en los FCA y el cáncer. La prevalencia de los FCA es del 15-77% en población sana y del 80-100% en pacientes con CCR. Son lesiones altamente dinámicas, pero los estudios que investigan sobre posibles agentes y factores protectores han obtenido resultados divergentes. Esto podría estar relacionado con la dificultad en la técnica endoscópica, la alta variabilidad en la clasificación entre patólogos y una posible diferencia en la prevalencia de los FCA entre los diferentes grupos étnicos(120).

Los FCA pueden clasificarse como displásicos o hiperplásicos(121). Los FCA displásicos se caracterizan por una proliferación epitelial anormal en su parte luminal, carencia de

metilación y mutación *KRAS* y son considerados como precursores del adenoma tradicional (AT) en la secuencia adenoma-carcinoma. Los FCA displásicos también se consideran precursores en la carcinogénesis de la PAF, pero en este síndrome casi siempre presentan una mutación *APC* y rara vez una mutación *KRAS*.

Para los FCA hiperplásicos se han propuesto dos vías diferentes. Los FCA hiperplásicos no *serrados* son considerados precursores de pólipos hiperplásicos en el colon distal y el recto. Se caracterizan por mutaciones *KRAS* y una pérdida del alelo 1p(122). Los FCA hiperplásicos tipo *serrado* a menudo presentan mutaciones *BRAF* y el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) considerándose precursores del pólipo/adenoma *serrado* sésil (P/ASS) en el colon proximal los cuales evolucionan mediante la vía *serrada*.

### 2.3.1.3. Vía del pólipo *Serrado*

Tradicionalmente los pólipos colorrectales se han clasificado como hiperplásicos o adenomatosos. Durante años los pólipos hiperplásicos fueron considerados benignos, sin ningún potencial maligno. Sin embargo, a finales de la década de 1980, un gran número de estudios sugirió que el CCR podría desarrollarse a partir de pólipos hiperplásicos en el contexto de lo que hoy se conoce como el Síndrome de poliposis *Serrrada* (SPS). Algunos estudios señalaron que los pacientes con SPS presentaban un 35% más de riesgo de aparición de CCR y un mayor riesgo de tumores sincrónicos(123). Estudios clínicos basados en colonoscopias de cribado demostraron que los pólipos *serrados* están asociados al desarrollo de adenomas sincrónicos y metacrónicos avanzados y a la progresión hacia el CCR (124). Debe encontrarse al menos uno de los criterios empíricos para el diagnóstico de SPS: al menos 5 pólipos *serrados* (2 o más mayores de 10 mm) proximales al colon sigmoide, cualquier número de pólipos *serrados* proximales al colon sigmoide en un individuo con un familiar de 1<sup>er</sup> grado con SPS y/o más de 20 pólipos *serrados* de cualquier tamaño con distribución en todo el marco cólico.

#### 2.3.1.3.1. Clasificación de pólipos *serrados*

En 1990, se describió una serie de 110 pólipos "adenomatosos hiperplásicos mixtos"(125) con una morfología *serrada* de pólipo hiperplásico pero con cambios citológicos semejantes a los observados en adenomas tradicionales. En 1996 se demostró por primera vez que los pólipos en el SPS tenían características similares a los adenomas

## INTRODUCCIÓN

*serrados*, aunque con menos atipia, y con una morfología predominantemente sésil a diferencia de los pólipos hiperplásicos típicos(126). Posteriormente, un estudio más exhaustivo describió un subconjunto de pólipos *serrados* con una distorsión de las criptas y proliferación desordenada, los cuales eran predominantemente sésiles y se localizaban en el lado derecho del colon(127). En el año 2005, estos hallazgos propusieron una nueva nomenclatura para los pólipos *serrados*(128). El término "adenoma" usado para describir lesiones sésiles ha sido tema de controversia debido a que los adenomas convencionales son displásicos, mientras que los ASS carecen de displasia citológica, aunque manifiestan una proliferación desordenada y una arquitectura críptica. Se optó por el término P/ASS(129).

- **Pólipo hiperplásico**

Los pólipos hiperplásicos (PH) tienen una cripta de base estrecha alineada con células proliferativas y *serradas* en el tercio superior de la glándula. Los PH se subdividen en tres variantes, ricos en células de Globet, microvesiculares (precursores de los P/ASS) y pobres en mucina. En general, los PH son lesiones sésiles con una alta prevalencia y suelen localizarse principalmente en el colon distal y recto(130). Endoscópicamente, los PH se caracterizan por ser lisos, simétricos y de aspecto pálido. Los microvesiculares son lesiones precursoras de los P/ASS y presentan mutaciones *BRAF*<sup>V600E</sup>. Por otra lado, los ricos en células de Globet, , pueden presentar mutaciones *KRAS* hasta en un 43%(131) y los de gran tamaño, pueden progresar a pólipos *serrados* displásicos (PSD) y también presentar mutación *KRAS* (132).

- **Pólipo o Adenoma *Serrado* sésil**

Los P/ASS se caracterizan por presentar un crecimiento desordenado y una arquitectura alterada de las criptas (formaciones *serradas*) del epitelio; dichas criptas presentan dilataciones en su base y conformaciones en T o L. Los P/ASS pueden presentar áreas de displasia citológica y de adenocarcinoma; aunque los tumores con progresión neoplásica tienden a perder la característica *serrada* (133). Es común que se desarrollen a partir de PH microvesiculares(134). En general, suelen ser de mayor tamaño que los PH y localizarse en colon proximal. Endoscópicamente se caracterizan por tener un tamaño mayor de 5 mm, pueden ser planos o sésiles, presentan un recubrimiento de superficie lisa en la mucosa con bordes mal definidos e irregulares, estas características conllevan a que endoscópicamente presenten dificultad para su detección (135).



- **Pólipos *Serrados* displásicos**

Los PSD contienen glándulas *serradas* y displasia citológica. Existen dos categorías, los P/ASS displásicos, que presenta características morfológicas de P/ASS con un área de displasia convencional y los adenomas *serrados* tradicionales (AST) que además de contener células *serradas* también presentan células epiteliales displásicas y criptas ectópicas con bases no adyacentes a la muscularis mucosa, en comparación con los P/ASS displásicos donde las criptas formadas generalmente se encuentran ancladas a la muscularis mucosa. Los AST se diferencian de los P/ASS displásicos por su localización distal, morfología polipoide, arquitectura tubulovillosa y un marcado citoplasma eosinofílico (136). Los AST con frecuencia presentan mutaciones *KRAS*, aunque también se han identificado fenotipos con mutaciones *BRAF* (137).

### 2.3.1.3.2. Alteraciones moleculares de lesiones *serradas*

Las criptas *serradas* se caracterizan por la presencia de mutaciones *BRAF*; los PH con mutaciones *KRAS* presentan pocas o ausencia de glándulas *serradas*. Los tumores desarrollados a partir de un PH tienen una incidencia de inestabilidad de microsatélites (MSI) más alta de lo esperado (138). Según un estudio, los P/ASS sin/con displasia descritos en piezas de colectomías tenían más probabilidades de presentar MSI, aunque otros estudios se observó que se encontraba con mayor predominancia en AST que en muestras controles (37.5% vs. 11%)(139). Por otro lado, se ha observado MSI tan solo en áreas de ASS avanzados con focos de carcinoma, lo que sugiere que la MSI se desarrolla tarde en la vía *serrada*. La pérdida de expresión epigenética de MLH1 a través de su metilación es la causa subyacente de la MSI en lesiones *serradas* y es un factor importante en la progresión al cáncer invasivo (131). Una gran proporción de carcinomas de origen *serrado* manifiestan una estabilidad de microsatélites (MSS) y con frecuencia presentan mutación *TP53*, lo que puede explicar el fenotipo más agresivo y su peor pronóstico en comparación a tumores asociados a MSI (HRR, 2,97; IC 95%, 2.05-4.32)(140). CIMP se observa tanto en el PH como en los P/ASS proximales(141). Se detectó CIMP en PH microvesiculares en un 47%, un 75% en P/ASS y un 80% en AST. Usando una definición más rigurosa de metilación (marcadores  $\geq 4/5$ ), se detectó CIMP en el 11% de PH microvesiculares, en comparación del 40% en los P/ASS. CIMP incluso se ha detectado en la mucosa colónica histológicamente normal de pacientes con PH

## INTRODUCCIÓN

(142). Los niveles más altos de CIMP se encontraron con mayor frecuencia en los P/ASS (con o sin displasia) que en los AST o carcinomas convencionales. En conjunto, estos datos indican que la metilación específica en las islas CpG puede facilitar la transición de PH microvesicular a P/ASS. Se han estudiado las mutaciones *BRAF* y *KRAS* en una serie de pólipos *serrados* evidenciándose mutaciones *BRAF* en el 36% de los PH y en el 100% de los P/ASS. La sustitución V600E es la mutación BRAF más común en humanos, incluido en el CCR de origen *serrado*(143). Usando las definiciones histológicas actuales, el 70-76% de los PH microvesiculares y el 75-83% de los P/ASS tienen mutaciones *BRAF*<sup>V600E</sup>. Por otro lado, esta mutación se ha detectado en un 5% de tumores con MSS y en un 52% de tumores asociados a la MSI(140). Sin embargo, las revisiones histológicas han confirmado que la mutación *BRAF* casi nunca se detecta en adenomas convencionales o en el síndrome de Lynch, resaltando la asociación de la mutación *BRAF* con la vía *serrada* y no con la MSI. La mutación *BRAF* esta asociada fuertemente con CIMP (144). Estos hallazgos apoyan el papel de CIMP y la vía *Mitogen-Activated protein Kinases* (MAPK) en la activación de la mutación *BRAF* o *KRAS* en la vía del pólipo *serrado* (Tabla 4).

Tabla 4. Características clínicas y moleculares de lesiones *serradas*(145).

	LESIONES <i>SERRADAS</i>			
	Pólipo Hiperplásico	Adenoma/Pólipo <i>serrado</i> sésil		Adenoma <i>serrado</i> Tradicional
		Sin Displasia	Con Displasia	
Alteración Molecular	Frecuencia			
CIMP-H	+	+++	+++	++
Metilación MLH-1	-	-	++	-
MSI	-	-	++	-
Mutación BRAF	+	+++	+++	+
Mutación KRAS	+	-	-	+
Clínica	Características			
Prevalencia (%)	Muy común	Común		Raro
Proporción de lesiones <i>serradas</i>	70-95%	5-25%		Menos 2%
Localización	Colon Distal, Recto	Colon Proximal		Colon Distal, Recto
Forma	Plano, Sésil	Plano, Sésil		Sésil o Pediculado
Tamaño	Menos de 5mm	Mayor que el Hiperplásico		Mayor que el Hiperplásico

### 2.3.1.3.3. Inicio y progresión de la vía del pólipo *serrado*

La activación del gen *BRAF* en el epitelio melanocítico normal y en el epitelio gastrointestinal del ratón da como resultado un estallido inicial de proliferación seguido de senescencia celular (146). La inhibición inducida por metilación de p16INK4a es un evento precoz en la vía *serrada* y puede ser suficiente para permitir que las células colorrectales (posibles PH microvesiculares) escapen de la senescencia inducida por *BRAF*(147). En los melanocitos, el gen *BRAF* activado es suficiente para la síntesis y secreción de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 7 (IGFBP7) que a su vez inhibe la señalización MAPK e induce senescencia y apoptosis(148). Las

## INTRODUCCIÓN

células columnares grandes vacuoladas en las criptas de los PH microvesiculares y P/ASS son una manifestación de la senescencia celular (142). La inhibición a través de la metilación del IGFBP7, mutaciones *BRAF* y CIMP en células con CCR permite la proliferación celular sin restricciones y la progresión a P/ASS al permitir el escape de la senescencia inducida por *p53*(149) (Figura 9). Por lo tanto, los efectos carcinogénicos adicionales de las mutaciones *BRAF* y CIMP pueden ser el resultado de la inhibición de genes supresores de tumores tales como p16INK4a e IGFBP7 a través de la hipermetilación.

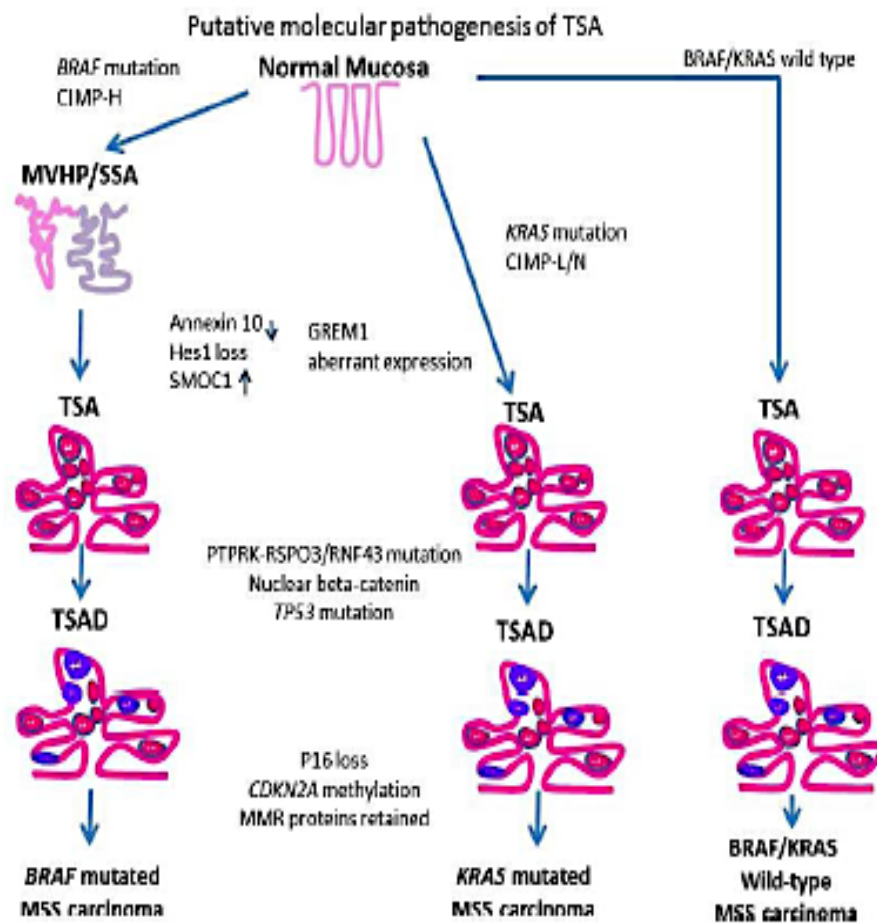


Figura 9. La vía del pólipo o adenoma serrada sésil(150).

### 2.3.1.3.4. Detección y vigilancia de pólipos serrados

La detección de pólipos *serrados* a través de las modalidades de cribado actualmente disponibles puede ser difícil. Tienen menos probabilidades de sangrado y, por lo tanto,

pueden no detectarse mediante el análisis de sangre oculta en heces (SOH)(151). La colonoscopia tiene un rendimiento relativamente bajo en la detección de pólipos *serrados*, lo que puede explicar en parte la disminución en los últimos años de las tasas de mortalidad del CCR de lado izquierdo, pero no la de lado derecho(152). Esto puede deberse a una preparación deficiente y a una mala visualización de las lesiones planas y cubiertas de mucosa en el lado derecho del colon. Ensayos aleatorizados han demostrado que la cromoendoscopia mejora la detección de pólipos *serrados*. La importancia de la detección y eliminación de pólipos *serrados* se debe a la evidencia de que los cánceres de intervalo (evidenciados a pesar de la detección y vigilancia adecuada por colonoscopia) tienen cuatro veces más probabilidades de estar asociados con MSI(153) y CIMP, siendo estos más proximales y mucinosos, características sugestivas de la mutación *BRAF* (154).

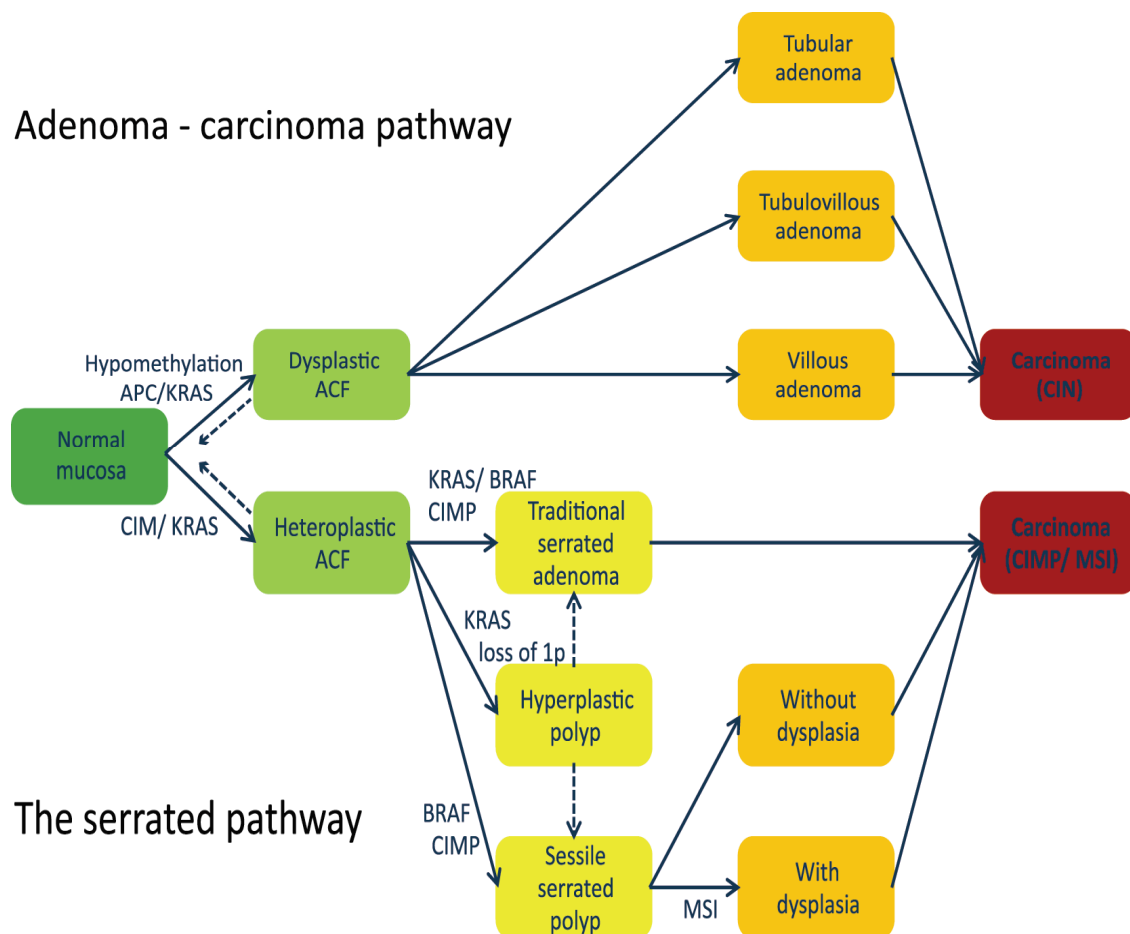


Figura 10. Desarrollo morfológico del cáncer colorrectal(145).

## INTRODUCCIÓN

### 2.3.2. Fenotipos Moleculares

La evidencia sugiere que el CCR hereditario y esporádico son causados por sucesos genéticos y moleculares secuenciales. Hay tres vías distintas en la patogénesis del CCR: la vía de inestabilidad cromosómica (CIN), la vía de MSI y la vía del CIMP.

#### 2.3.2.1. Vía de la inestabilidad cromosómica

El mecanismo más frecuente en el CCR es CIN (65-70%) y se caracteriza por defectos y alteraciones en la segregación cromosómica, la estabilidad de los telómeros y la respuesta al daño del ADN. La presencia de una inestabilidad genómica es una característica distintiva de la tumorigénesis. En condiciones fisiológicas normales, la mitosis genera dos células hijas con el mismo número de cromosomas que la célula original. Sin embargo, algunas células genéticamente alteradas pueden llegar a dividirse realizando un reparto desigual de cromosomas. Como consecuencia, las células resultantes tendrán numerosas regiones cromosómicas perdidas, duplicadas o una pérdida de heterocigosidad (LOH), lo cual implicará la carencia y/o sobrerepresentación de multitud de genes. A pesar de que se ha logrado un progreso sustancial en la identificación de las causas de CIN en el CCR, sus mecanismos subyacentes siguen siendo desconocidos(117). Los posibles mecanismos incluyen alteraciones en la segregación cromosómica, disfunción de los telómeros y en la respuesta al daño del ADN, afectando genes importantes como *TP53* y *APC*. Las mutaciones de pérdida de función del *TP53*, que es el gen del punto de control del ciclo celular principal, producen una entrada incontrolada en dicho ciclo(117). Los casos de CCR con CIN se caracterizan por la presencia de alteraciones somáticas extensas en el número de copias en todo el genoma dando como resultado tumores aneuploides y pérdida de heterocigosidad (LOH)(155). Las mutaciones en *APC*, que están asociadas con defectos en la segregación cromosómica(156), también se asocian fuertemente con CIN promoviendo la progresión al CCR. El gen *APC* forma parte de la vía de señalización Wnt- $\beta$ -catenina(157), y su inactivación da como resultado un aumento en la expresión nuclear de *CTNNB1* y la proliferación celular. Por lo tanto, la vía de señalización Wnt- $\beta$ -catenina juega un papel protector en los carcinomas CIN positivos. Una teoría considera que los carcinomas tienen un origen clónico, ya que surgen de una única célula genómicamente inestable, pero a su vez, desarrollan una heterogeneidad genética debido a CIN. Esto explica la heterogeneidad observada entre los tumores con

respecto al contenido de ADN, el número cromosómico, la expresión génica, el metabolismo, la resistencia a los fármacos citotóxicos y el potencial metastásico(158).

### 2.3.2.1.1. Mecanismos etiológicos

- **Defectos en la segregación cromosómica**

El fenotipo CIN puede ser el resultado de defectos en las vías que regulan la segregación cromosómica. El punto de control de la mitosis o del ensamblaje del huso mitótico garantiza la segregación cromosómica adecuada al retrasar la transición de metafase a anafase hasta que todos los pares de cromátidas duplicadas estén alineados correctamente en el huso. Los genes codificantes de proteínas que funcionan como reguladores del punto de control de la mitosis incluyen los *mitotic arrest-deficient* (MAD1L1 y MAD2L1), el *budding uninhibited by benzimidazoles 1* (BUB1) y el *kinesin family member 11* (KIF11). Las mutaciones en BUB1 dan como resultado un ensamblaje del huso mitótico anormal y una inestabilidad en las líneas celulares cromosómicamente estables(159). Las células de los ratones mutantes mBUB1 negativos demuestran un escape a la apoptosis, la progresión continua del ciclo celular y la ruptura de los husos mitóticos(160). La proteína Kinesin, también conocida como Eg5, es una proteína motora responsable de la formación del huso mitótico y de la separación cromosómica durante la mitosis.

La sobreexpresión de Eg5 en ratones produce defectos del huso, CIN y formación de tumores sólidos(161). La falta de segregación cromosómica debida a defectos en el punto de control mitótico puede conducir a aneuploidía, un concepto propuesto por primera vez por Theodor Boveri en 1902, mucho antes de la llegada del cariotipo cromosómico(2). La hipótesis de aneuploidía propone un mecanismo de dos pasos para el desarrollo tumoral. El primer paso es un defecto en la formación del huso mitótico que promueve la mala segregación cromosómica y la aneuploidía. En el segundo paso, la aneuploidía desestabiliza el genoma, dando lugar a mutaciones policlonales teniendo como resultado cariotipos heterogéneos. Por lo tanto, la aneuploidía estimula la tumorigénesis ya sea aumentando las posibilidades de LOH de un gen supresor de tumores o mediante la amplificación de un oncogén a través de la duplicación cromosómica(161).

## INTRODUCCIÓN

- **Disfunción del Telómero**

CIN también puede ser impulsado por la disfunción de los telómeros. Los telómeros son repeticiones de ADN de tipo hexamérico (TTAGGG en humanos) que protegen los extremos de los cromosomas eucariotas de la fusión y la ruptura durante la segregación. Una porción del ADN telomérico se pierde después de cada ciclo de replicación del ADN debido a la incapacidad de la ADN polimerasa para sintetizar por completo el extremo 3' de los cromosomas. Las células con telómeros suficientemente acortados se dirigen a la senescencia y la apoptosis mediante puntos de control de daños en el ADN. Las células que sobreviven al punto de control activan la telomerasa, que a su vez alargan los telómeros. En ratones deficientes en el componente de ARN de la telomerasa (*Terc*<sup>-/-</sup>), el acortamiento de los telómeros da como resultado focos de criptas aberrantes, adenomas y tumores gastrointestinales(162). El 77-90% de los CCR albergan telómeros más cortos, en comparación con el tejido normal adyacente, aunque también se ha informado un aumento en la actividad de la telomerasa(163). Estos hallazgos sugieren que el acortamiento de los telómeros promueve CIN que da inicio a la carcinogénesis, mientras que la activación de la telomerasa en carcinomas establecidos conduce a la inmortalidad de las células cancerígenas.

- **Pérdida de heterocigosidad**

LOH es una característica clave de los tumores CIN positivos y distingue los tumores que surgen de la ruta CIN de los tumores que surgen de la vía MSI. Aproximadamente el 25-30% de los alelos se pierden en los tumores(164). La no disyunción mitótica, la recombinación entre cromosomas homólogos y la delección cromosómica se encuentran entre los mecanismos implicados. Un estudio concluyó que la mayoría de las pérdidas en el cromosoma 18 involucraban a todo el cromosoma y eran causadas por la no disyunción mitótica. Se pensaba que las pérdidas limitadas a una parte de un cromosoma se debían a recombinaciones y deleciones intercromosómicas asociadas con las roturas de dobles cadenas de ADN(165).

- **Deficiencias en la respuesta al daño del ADN**

Las deficiencias en la respuesta al daño del ADN se han relacionado con carcinomas. Las mutaciones inactivas en la ataxia telangiectasia mutada (ATM) y la ataxia telangiectasia y las proteínas quinasas relacionadas con Rad3 (ATR) conducen al síndrome de ataxia telangiectasia y al síndrome de Seckel, respectivamente(166). Otras entidades



relacionadas con la deficiencia en la respuesta al daño en el ADN incluyen: el síndrome de Li-Fraumeni (mutación *TP53*) y el cáncer hereditario de mama y ovario (mutaciones *BRCA1* y *BRCA2*). De estos genes, solo el *TP53* ha sido directamente implicado en el CCR. La haplo-insuficiencia de la histona H2AX, un sustrato del ATM y de ATR, conduce a la inestabilidad genómica y a la susceptibilidad tumoral en un entorno deficiente en p53, por otro lado, los fibroblastos embrionarios de ratón derivados de los ratones *ATM*<sup>-</sup> y *H2A*<sup>x-</sup> deficientes muestran una inestabilidad genómica grave(167). La deficiencia en *Chk1*, una proteína de punto de control de daño en el ADN causa defectos mitóticos e interrumpe la Aurora B durante la mitosis, lo que resulta en la falla de la citocinesis y la multinucleación(168).

### 2.3.2.1.2. Anomalías genéticas

Estudios recientes han identificado más de 80 mutaciones somáticas en exones de tumores colorrectales. Sin embargo, un número limitado de estas mutaciones se encuentran en un porcentaje significativo de tumores. Se predijo que quizás 15 o menos de estas mutaciones en cualquier caso de CCR son conductores críticos de iniciación, progresión y/o mantenimiento del tumor(169). Muchos de los genes identificados por el análisis de secuenciación ya eran conocidos por estar mutados somáticamente en el CCR. En la Tabla 5 se describen oncogenes y genes supresores mutados somáticamente en CCR.

- **APC**

El evento genético más precoz en la carcinogénesis colorrectal es la activación de la vía Wnt- $\beta$ -catenina, típicamente a través de la interrupción de *APC* en 5q21(170).

El producto del gen *APC* es una proteína de aproximadamente 300 kDa con múltiples dominios funcionales que regulan la diferenciación, adhesión, polaridad, migración, desarrollo, apoptosis y segregación cromosómica.

## INTRODUCCIÓN

Tabla 5. Oncogenes y Genes supresores mutados somáticamente en CCR

Gen	Localización cromosómica	Tipo de mutación	Prevalencia (%)	Función del producto del gen
<b>Oncogenes</b>				
<b>KRAS</b>	12p12	Mutación puntual (codones 12, 13 del exón 2)	40	Proliferación celular y supervivencia
<b>PIK3CA</b>	3q26	Mutaciones puntuales (E545K en el exón 9, H1047R en el exón 20)	15-30	Proliferación celular y supervivencia
<b>CDK8</b>	13q12	Amplificación génica	10-15	Activación de $\beta$ -catenina
<b>EGFR</b>	7p12	Amplificación génica	5-15	Proliferación celular y supervivencia
<b>BRAF</b>	7q34	Mutaciones puntuales que activan la actividad de la quinasa (más comúnmente V <sup>600E</sup> )	5-10	Proliferación celular y supervivencia
<b>CMYC</b>	8q24	Amplificación génica	5-10	Proliferación celular y supervivencia
<b>Genes supresores</b>				
<b>APC</b>	5q21	Mutación puntual, delección, pérdida de alelos que conducen a una proteína defectuosa	70-80	Inhibición de señalización Wnt
<b>TP53</b>	17q13	Mutación puntual, pérdida de alelos	60-70	Arresto del ciclo celular, apoptosis e inducción de la autofagia
<b>DCC</b>	18q21	Mutación puntual	50	Receptor de superficie celular para netrin-1, desencadena apoptosis de células tumorales
<b>TGF<math>\beta</math>RII</b>	3p22	Mutación puntual	25	Inhibición del crecimiento celular
<b>SMAD4</b>	18q21	Mutación puntual, pérdida de alelos	10-15	Mediador intracelular de la ruta TGF- $\beta$

En el CCR esporádico, las mutaciones *APC* están presentes en adenomas microscópicos, en el 50-60% de adenomas pequeños (<0,5 cm) y se encuentran con similar frecuencia en adenomas y carcinomas avanzados, lo que indica que las mutaciones inactivas en *APC* son un evento precoz en la carcinogénesis colorrectal(171). Se argumentó que *APC* es un "gen guardián" que es "responsable de mantener un número de células constante en la renovación de poblaciones celulares"(172). Casi todas las mutaciones somáticas conducen al fallo prematuro de la proteína APC. Ambos alelos APC se inactivan en adenomas y carcinomas que surgen en pacientes con PAF, así como en el carcinoma esporádico. Mientras que las mutaciones inactivas de la línea germinal en *APC* se localizan en todo el gen, las mutaciones somáticas se agrupan entre los codones 1286 y 1513(173). Un mecanismo alternativo para la inactivación del gen *APC* puede ser la hipermetilación del promotor APC, que se ha informado en el 18% de los adenomas y carcinomas colorrectales(174).

- **Otras mutaciones**

Las mutaciones somáticas función-ganancia en  $\beta$ -catenina (CTNNB1) que afectan a los aminoácidos clave en la fosforilación y ubiquitinación del N-terminal de la  $\beta$ -catenina se han identificado en un subconjunto del CCR, aunque son comunes en otros tipos de cáncer. Sin embargo, estas mutaciones se han encontrado en el 50% de los carcinomas con *APC wild-type*, lo que subraya la importancia de la vía de Wnt- $\beta$ -catenina en el CCR(175). Se identificó una mutación germinal en AXIN2 en una familia con CCR familiar y agenesia dental, lo que sugiere que la mutación puede haber interferido con la función de Axin en la regulación de  $\beta$ -catenina(176).

- **KRAS**

La familia RAS de proteínas-G pequeñas incluyen: *K-RAS4A*, *K-RAS4B*, *H-RAS* y *N-RAS*, que son interruptores moleculares de los receptores del factor de crecimiento, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)(177). El EGFR es afectado por mutaciones somáticas en menos del 5% de los CCR. Por el contrario, el oncogén *KRAS* está mutado en 40% de los CCR. Las mutaciones puntuales de un solo nucleótido en los codones 12 y 13 del exón 2, el codon 146 en el exón 4 y raramente en el codon 61 del exón 3, bloquean la enzima en forma activada del trifosfato de guanosina (GTP) que conduce a la activación constitutiva de RAS. Un pequeño número de casos de CCR tienen mutaciones *NRAS* en el codon 12, 13 o 61. Las mutaciones *KRAS* se encuentran con

## INTRODUCCIÓN

frecuencia en focos de criptas aberrantes, pero no son necesarios para el inicio del adenoma(178). Las mutaciones *KRAS* se observan en el 10% de adenomas menores de 1 cm y en el 40-50% de adenomas > 1 cm, lo que sugiere que juega un papel en la progresión del adenoma colorrectal(179). La disrupción dirigida de los alelos *KRAS* mutantes en líneas celulares con CCR redujo el crecimiento celular, mientras que la activación de la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> aceleró el crecimiento tumoral en un modelo de ratón con CCR esporádico(180). El mejor efector característico de *KRAS* es la vía de la cinasa regulada por señal (ERK)/MAPK. La familia RAF incluye tres quinasas serina-treonina (A-RAF, B-RAF y C-RAF) que fosforilan MAPK1 y MAPK2, los cuales activan ERK1 y ERK2. ERK a su vez activan sustratos como el JUN y ELK1, factores de transcripción que regulan genes como la ciclina D1, involucrada en el control del ciclo celular(181). *RAS* está relacionado con el factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), un factor de transcripción que regula la respuesta inmune y la supervivencia celular. TBK1 puede activar NF- $\kappa$ B mediante la fosforilación de su inhibidor I $\kappa$ B. La señalización de TBK1 y NF- $\kappa$ B es esencial en tumores mediados por *KRAS*; la supresión de la apoptosis es inducida por TBK1 específicamente en líneas celulares cancerígenas transformadas con *KRAS*, mientras que la inhibición de NF- $\kappa$ B bloquea la formación de tumores en pulmón, inducida por *RAS*, en ratones(182).

- ***TP53***

El gen *TP53* se encuentra en el cromosoma 17p y codifica un factor de transcripción que es un supresor tumoral y regulador principal de cientos de genes implicados en el metabolismo del ADN, apoptosis, autofagia, regulación del ciclo celular, senescencia, angiogénesis, respuesta inmune, diferenciación celular, motilidad y migración. La disfunción del p53 es casi universal en tumores de seres humanos, y la pérdida de la función p53 se informa en 4-26% de los adenomas, 50% de los adenomas con focos de carcinoma y 50-75% en el CCR, lo que sugiere que la mutación *TP53* y LOH juegan un papel principal en la transición de adenoma a carcinoma(183). Los defectos *TP53* en la transición adenoma-carcinoma reflejan el hecho que situaciones estresantes tales como la rotura del ADN, la erosión de los telómeros y la hipoxia pueden activar las vías apoptóticas y de detención del ciclo celular en células tumorales con función de *TP53* wild-type. Como tal, las mutaciones en *TP53* pueden facilitar el crecimiento y la invasión continua en situaciones de stress, que de lo contrario podrían dificultar la supervivencia de las células tumorales en la transición adenoma-carcinoma. Aproximadamente el 80%

de las mutaciones *TP53* son mutaciones de sentido erróneo (missense), que conducen a la síntesis de una proteína parcialmente inactiva. *TP53* es inducido por proteínas oncogénicas tales como c-Myc, RAS, y adenovirus E1A. *TP53* normalmente está regulado negativamente por MDM2, E3-ubiquitin ligasa y MDM4, que dirigen su ubiquitinación, mientras que en situaciones de estrés se permite la función de *TP53*(184).

- **Aneuploidy: Pérdida de 18q**

La pérdida alélica en el cromosoma 18q ha sido identificada en hasta un 70% de los casos de CCR, particularmente en etapas avanzadas. Los supresores tumorales ubicados en 18q incluyen: *deleted in colorectal carcinoma (DCC)*, *SMAD2*, *SMAD4* y *Cables*. La expresión del gen *DCC* está ausente o marcadamente reducida en la mayoría de CCR avanzado(185). *DCC* codifica un receptor para netrin-1 e induce apoptosis a menos que se una a su ligando(186). Sin embargo, un modelo de ratón *DCC* mutante no desarrolló el carcinoma, por lo que surgieron dudas sobre su papel en la carcinogénesis(187). Un grupo dirigido por Patric Mehlen informó recientemente que los ratones en los que la actividad proapoptótica de *DCC* está genéticamente silenciada desarrollan neoplasia intestinal espontánea y, en un trasfondo de *APC* mutante, un adenocarcinoma más invasivo. Por lo tanto, *DCC* suprime la formación de tumores colorrectales por inducción de apoptosis de células tumorales(188). Las mutaciones *SMAD2* y *SMAD4* se han encontrado en el 10 y el 15% de casos de CRC, respectivamente(189). Las mutaciones en *SMAD4* se encuentran en un subgrupo de pacientes con síndrome de poliposis juvenil (JPS), que se caracteriza por la aparición de pólipos hamartomatosos múltiples en todo el tracto GI en la infancia con una mayor incidencia de cánceres de estómago, intestino delgado, colon y páncreas(190). La proteína *Cables* aumenta la fosforilación de la tirosina de las quinasas dependientes de ciclina (cdk2, cdk3 y cdk5) por las quinasas tirosina no receptoras (Src, Abl y Wee1). La pérdida de expresión *Cables* se encuentran en el 60-70% del CCR esporádico, y la pérdida de *Cables* en ratones potencia la tumorigénesis colónica inducida por carcinógenos(191).

## INTRODUCCIÓN

### 2.3.2.1.3. Aspectos clínicos

Los pacientes con mutaciones activadas *KRAS* y *BRAF* pueden experimentar peores resultados en SG en comparación con los pacientes *wild-type*(192). Los pacientes con tumores que albergan mutaciones *KRAS* y *PIK3CA* tienen más probabilidades de desarrollar metástasis hepáticas en comparación con los pacientes de *wild-type*(193). La mutación *TP53* puede estar asociada con una mayor mortalidad, pero este riesgo puede estar limitado a pacientes con enfermedad metastásica(194). Existen informes contradictorios sobre si la delección del cromosoma 18q se asocia con peores resultados oncológicos; las delecciones individuales cromosómicas se usan actualmente como marcadores moleculares para el pronóstico en el CCR(195). Los pacientes con tumores *KRAS* mutados no responden de forma apreciable a la inhibición del EGFR; el uso de agentes tales como el cetuximab se limitan, por lo tanto, a pacientes con cáncer de tipo *KRAS wild-type*(196). Un reciente ensayo clínico de fase I examinó el tratamiento de tumores con mutaciones *BRAF*<sup>V600E</sup> con Vemurafenib, un inhibidor específico de la proteína BRAF, demostrando resultados mixtos lo que sugieren la presencia de mecanismos de resistencia primaria(197).

### 2.3.2.2. Vía de la inestabilidad de microsatélites

El fenotipo más estudiado es la MSI, el cual se desarrolla a partir de defectos en la reparación de daños en el ADN o MMR y se encuentra aproximadamente en el 15% de todos los casos, de los cuales el 3% están asociados al CCHNP.

En 1993, Manuel Perucho y col. realizaron la amplificación de miles de secuencias en el cáncer de colon y combinaron muestras de tejido normal utilizando *primers* elegidos al azar. Su grupo encontró que el 12% de los tumores tenían bandas de longitud más corta. Las secuencias de estas bandas contenían elementos repetitivos simples (es decir, microsatélites), principalmente en trectos de poliadenina ( $A_n$ ) asociados con secuencias Alu. Un trabajo adicional reveló que los tumores con estas mutaciones somáticas se asociaron con características clínicas distintas. Los tumores tenían una probabilidad significativamente mayor de aparecer en el colon proximal, menos probabilidades de ser invasivos, menos probabilidades de albergar mutaciones *KRAS* o *TP53*, con mayor probabilidad de ser poco diferenciados y encontrarse en pacientes más jóvenes(198). Al mismo tiempo, Stephen Thibodeau identificó mutaciones de delección en secuencias  $A_n$

en los cromosomas 5q, 15q, 17p y 18q en tumores colorrectales, acuñando el término de MSI. Similar a los hallazgos de Perucho, el grupo de Thibodeau informó que MSI se observaban en el 28% de los tumores colorrectales y encontró que el 89% de estos tumores estaban localizados en el colon proximal y se asociaron con un mejor pronóstico que los tumores MSS(199). Los estudios de alotipado encontraron que el 15% de los casos de CCR no tuvieron LOH aparente; posteriormente se descubrió que estos tumores albergaban MSI(200). Tanto los grupos de Perucho como de Thibodeau reconocieron que la MSI representa una vía única para el desarrollo de CCR.

### **2.3.2.2.1. Sistema de MMR en ADN**

El sistema de reparación MMR es un mecanismo celular encargado de reconocer y reparar determinados errores en el ADN, incluyendo inserciones, deleciones e incorporaciones erróneas de bases. Estos cambios pueden surgir como consecuencia del daño en el ADN, producto de la recombinación o por no haber sido reparado por los sistemas de reconocimiento de errores de las polimerasas durante la replicación. La mayoría de los casos de CCHNP se deben a mutaciones en los genes MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 que alteran el correcto funcionamiento de las proteínas. En alrededor de la mitad de los casos de CCHNP, el gen mutado de forma germinal es MSH2, mientras que en el 30-40% lo es MLH1. MSH6 concentra un 7-10% de las mutaciones y PMS2 una proporción inferior al 5% del total. En estos dos últimos casos, la penetrancia del cáncer es menor y la edad de aparición de la enfermedad es más tardía. Estas frecuencias varían según la zona geográfica en función de las mutaciones fundadoras propias de cada región. Además, es importante destacar la presencia de variantes hipomórficas, las cuales reducen parcialmente la actividad de la proteína generada sin llegar a anular por completo su función. La aparición de mutaciones de novo también se ha reportado como mecanismo causal de SL, existiendo también mutaciones fundadoras y/o recurrentes. Existe también una proporción de casos cercana al 1-3% en el que determinadas deleciones afectando al gen EPCAM conllevan un silenciamiento epigenético de MSH2 en tejidos donde el gen EPCAM se expresa de forma constitutiva. Por último, la hipermetilación constitutiva de las islas CpG de MLH1, también se ha descrito como mecanismo causal de SL, ya que provoca la pérdida de expresión de la proteína, en este caso sin ninguna mutación genética identificable asociada. Es importante destacar que la pérdida alélica germinal propia del SL no es causa de la pérdida de función del sistema MMR.

## INTRODUCCIÓN

Investigaciones adicionales revelaron que MSI surge de defectos en el sistema de MMR, uno de varios sistemas de reparación de ADN. En células procariotas, el sistema MMR consiste en una familia de enzimas codificadas por los genes *mutS* y *mutL* que detectan los errores de replicación del ADN en los que la cadena recién sintetizada ha incorporado un nucleótido incorrecto. Estos desajustes de pares de bases únicos generalmente dan lugar a mutaciones puntuales. Es más probable que la ADN polimerasa cometa tales errores durante la replicación de secuencias largas de ADN repetitivas, como los microsatélites. El deslizamiento durante la replicación de una secuencia repetitiva da como resultado la formación de un bucle de inserción-eliminación que puede ser identificado y corregido por el sistema MMR. Si este ciclo no se repara, se produce una mutación, la que puede producir una proteína aberrante y no funcional(201).

### 2.3.2.2.2. Inestabilidad de microsatélites esporádica

Dos de las tres descripciones iniciales de MSI se realizaron en muestras de tejido de carcinoma de colon de tipo esporádicos, en lugar de tumores de pacientes con CCR familiar(199). Aproximadamente el 12-17% de todos los tumores colorrectales tienen MSI, mientras que solo el 3% de los carcinomas se identifican en familias con síndrome de Lynch; por lo tanto, la mayoría de los casos de CCR con MSI son esporádicos(202). Característicamente, el CCR esporádico con MSI se asocia con (1) ausencia de agrupamiento significativo en las familias, (2) metilación bialélica del promotor MLH1(203), (3) ausencia de proteínas MLH1 y PMS2 (no MSH2), (4) diploidia (74%), (5) mutación frecuente *BRAF* (generalmente V600E)(146), y (6) mejor pronóstico que los tumores de MSS(204). Sin embargo, la MSI se asocia con una peor supervivencia en CCR metastásico en el contexto de la mutación *BRAF*(205). Los pacientes con CCR esporádico y MSI tienden a ser de mayor edad que aquellos con CCR esporádico y MSS(206).



### 2.3.2.2.3. Fisiopatología

En 1995, Markowitz y col. examinaron el papel del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) en MSI; la señalización de TGF- $\beta$  inhibe la proliferación de células epiteliales colónicas. Descubrieron que el TGF- $\beta$  del tipo II (TGF $\beta$ R2) no se expresaba en las líneas celulares de CCR con MSI, pero se expresaba en líneas celulares MSS. Aquellas líneas celulares sin expresión del TGF $\beta$ R2 no ralentizaron la proliferación en respuesta a TGF- $\beta$ . Además, el estudio demostró que una delección de un solo par de bases en una secuencia A<sub>10</sub> repetitiva en TGF $\beta$ R2 se encontró en el 90% de 111 muestras de tumorales colorrectales con MSI-positivas, lo que sugirió un modelo en el que las secuencias repetitivas de ADN son sensibles a la pérdida de actividad MMR del ADN, que conduce a mutaciones, paradas prematuras de codones e inactivación de genes(207). Un gen supresor tumoral adicional con una MSI-High (MSI-H) es *ACVR2A*, que codifica el receptor de activina tipo II. Ambos alelos del gen *ACVR2A* están somáticamente mutados en un trayecto repetido de poliadenina en el exón 10 en aproximadamente el 85% de los CCR con MSI-H. La mutación resultante se asocia con la pérdida del receptor de activina tipo II y un peor pronóstico. Las células MSI-H en las que se ha restaurado la función de *ACVR2* o *TGF $\beta$ R2* presentan un crecimiento más lento. Aproximadamente un tercio de los casos de CCR con MSI-H albergan mutaciones en un trayecto repetido del gen *TCF7L2*, que codifica la proteína TCF4. TCF4 suprime la transcripción de ADN de los genes diana en la vía Wnt- $\beta$ -catenina en el contexto de la  $\beta$ -catenina estabilizada, que puede proporcionar una ruta adicional para la activación de Wnt- $\beta$ -catenina en el cáncer MSI-H(208). Han sido identificados varios otros genes afectados por MSI que codifican proteínas reguladoras de la proliferación celular (*GTB1*, *TCG - 4*, *WISP3*, *IGFP2R*, *Axin-2* y *CDX2*), ciclo celular (*BAX*, *caspasa-5*, *RIZ*, *BCL-10*, *PTEN*, *hG4-1* y *FAS*) y reparación del ADN (*MBD-4*, *BLM*, *CHK1*, *MLH3*, *RAD50*, *MSH3* y *MSH6*)(131). Sin embargo, no está claro cuáles de estas mutaciones tienen significación funcional (como se ha determinado con el *TGF $\beta$ R2*) y cuales son simplemente marcadores de MSI, debido a que la inactivación bialélica de estos genes no se ha documentado en todos los tumores. Por ejemplo, un estudio retrospectivo reciente no encontró asociación entre las mutaciones *BAX* en los tumores MSI-H y la SG del paciente (209). Los pasos clave en la ruta MSI hacia CCR se describen en la Figura 10. El descubrimiento de objetivos genéticos múltiples de la deficiencia de MMR que difieren del modelo clásico de Fearon y Vogelstein indica que el CCR asociado a MSI se produce a través de una vía biológica

## INTRODUCCIÓN

diferente de los tumores de MSS convencionales. Los tumores en la vía CIN surgen de una combinación de mutaciones genéticas y LOH, lo que origina la inactivación bialélica de *APC*. Por otro lado, los tumores colorrectales con MSI albergan un mayor número de mutaciones puntuales en comparación con los cánceres de MSS, tienen más probabilidades de ser diploides y no presentan una LOH generalizada. La gran mayoría de los tumores asociados a MSI tienen una expresión normal de *APC*, pero tienen mutaciones en  $\beta$ -catenina que impiden la unión a la proteína *APC* y su degradación, que es funcionalmente equivalente a la pérdida de esta proteína(210). Otros tumores asociados a MSI no tienen el *APC* inactivado ni  $\beta$ -catenina mutada, pero si mutaciones en otros factores de la vía Wnt- $\beta$ -catenina como TCF-4(201).

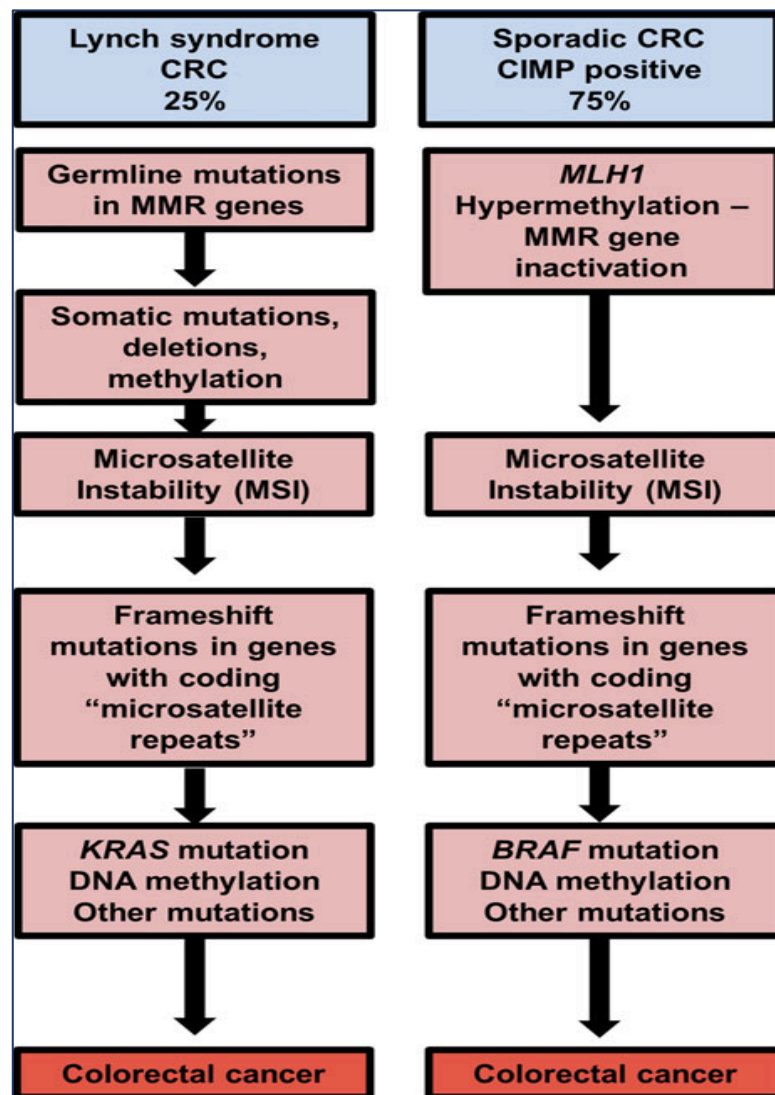


Figura 11. Vías moleculares del CCR asociado a MSI.

#### 2.3.2.2.4. Aspectos clínicos

La definición de MSI se estandarizó en una reunión de consenso internacional en 1997. El término MSI-H se utiliza cuando más del 30% de un panel de marcadores de un microsatélite definido está mutado. Aquellos casos de CCR en los que al menos 1, pero menos del 30%, de los marcadores están mutados se denominan MSI-low (MSI-L), los cuales tienen características clínicas de tumores MSS(211). Se ha reconocido otro tipo de MSI, llamado "*elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats*" (EMAST). EMAST se encuentra frecuentemente en tumores no colónicos, está asociado con mutaciones *TP53* y no es causado por la inactivación del sistema MMR(212). La prueba MSI se usa clínicamente para identificar pacientes con síndrome de Lynch, que comprende el 2-3% de casos de CCR. En MSI se identifican tumores colorrectales MMR-deficientes con un 93% de sensibilidad, mientras que la sensibilidad y especificidad del análisis inmunohistoquímico de MLH1 y MSH2 es del 92.3% y del 100%, respectivamente(213). La sensibilidad del análisis inmunohistoquímico mejora si la expresión de MSH6 y PMS2 se incluyen en el análisis. La tinción de tumores para proteínas MMR puede ser heterogénea, lo que puede limitar la sensibilidad. Los tumores MSI-H también se pueden distinguir de los tumores MSS por la presencia de linfocitos infiltrantes citotóxicos tumorales en el examen histológico, cuyo grado confiere de forma independiente una mejor supervivencia(214).

- **MSI y la respuesta a la Quimioterapia**

El fenotipo MMR está asociado con la resistencia a agentes citotóxicos en líneas celulares de CCR humano tales como HCT-116(215). La estabilidad en la activación de MMR en las líneas celulares aumenta la sensibilidad a los agentes alquilantes, 6-tioguanina (6-TG), 5-fluorouracilo (5-FU) y compuestos de platino(142). Con la excepción de un estudio(216), múltiples trabajos incluidos dos metanálisis, no han mostrado beneficio de la quimioterapia entre pacientes con tumores colorrectales asociados a MSI(217). Un estudio con mayor impacto, encontró una mortalidad tres veces mayor en pacientes con CCR estadio II en tumores asociados a MSI en comparación con MSS(218). Sin embargo, la MSI se asocia con una mejor respuesta a los inhibidores de topoisomerasa I como el Irinotecán(219).

## INTRODUCCIÓN

### 2.3.2.3. Fenotipo *CpG Island Methylator*

Aproximadamente un 70% de los promotores que regulan la expresión génica en humanos contienen regiones ricas en el dinucleótido citosina-guanina (CpG). Estas regiones, denominadas islas CpG, tienen una longitud superior a 200 pares de bases y una presencia de CpG incrementada en más del 60% de lo que correspondería por azar. La metilación de las citosinas de los dímeros CpG de estas islas supone un efectivo mecanismo de silenciamiento génico que permite regular la expresión de un gen sin necesidad de alterar su secuencia original. La metilación de genes concretos es un fenómeno frecuente en CCR como segundo evento inactivante de la expresión génica, tal y como se ha visto para APC, MCC o MLH1(220). Pero más allá de la metilación génica puntual, en algunos tumores de CCR se observa un patrón generalizado de metilación de islas CpG. Como consecuencia, multitud de genes son silenciados, incluyendo algunos que son clave para el mantenimiento homeostático de la célula. El fenotipo ligado a la metilación generalizada de estas islas se denomina CIMP, pudiéndose observar en alrededor de un 15% de los CCR esporádicos. Es el tercer fenotipo reconocido en el CCR. La metilación de nucleótidos desempeña un papel central en la regulación del ADN. Permite el empaquetamiento y la condensación de la molécula de ADN pudiendo lograr que un gen no se encuentre disponible para la transcripción. En algunos casos de CCR, se observa una hipermetilación en sitios específicos, mientras que al mismo tiempo se observa una hipometilación amplia del genoma con el avance en las etapas de la enfermedad. La combinación de un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanina (dinucleótido CpG) es relativamente poco frecuente en el genoma humano. Sin embargo, las bolsas de dinucleótidos CpG, denominadas islas CpG, se encuentran en las regiones promotoras de aproximadamente el 50% de todos los genes(221). En 1999, se demostró en un conjunto de genes específicos de cáncer que las islas CpG presentaban metilación exclusivamente en un subconjunto de líneas cancerígenas y muestras tumorales denominándose CIMP. Después de observar estos cambios tanto en pólipos como en carcinomas primarios, concluyeron que este fue un evento temprano en la carcinogénesis colorrectal que se asoció con la inactivación transcripcional de los genes supresores de tumores. También encontraron que las lesiones CIMP positivas se encontraban principalmente en el colon proximal(220). CIMP es considerada actualmente como una vía definida en la carcinogénesis colorrectal(222), catalogada como un evento temprano y el principal mecanismo de conducción en la vía *serrada* que conduce a la formación del

ASS en el colon proximal, del AST en la parte distal del colon y recto, y posteriormente al CCR(223). El fenotipo se ha asociado con la edad avanzada, el sexo femenino, la pobre diferenciación, la mutación *BRAF* y MSI(224). Se ha demostrado un impacto negativo del CIMP en el pronóstico, pero solo en tumores MSS(225). La metilación de las islas CpG es una modificación estable y se analiza fácilmente en tejidos fijados con formalina, en muestras sanguíneas y fecales. Actualmente no existe un acuerdo sobre el conjunto de marcadores para definir el fenotipo, pero existen varios paneles aprobados como biomarcadores en la detección temprana(226), el pronóstico o en la predicción de la eficacia al tratamiento(227). A diferencia de los tumores colorrectales en el síndrome de Lynch, el CCR esporádico con MSI surge a través de un mecanismo que involucra a CIMP(220). La hipermetilación de MLH1 es la principal causa de CCR esporádica por MSI(228).

### **2.4. Diagnóstico**

#### **2.4.1. Detección precoz**

La lenta evolución del pólipo premaligno al carcinoma invasor proporciona una interesante oportunidad para la prevención y la detección temprana del CCR. Las pruebas de cribado en pacientes asintomáticos logran, mediante la identificación de procesos premalignos, detectar e incluso eliminar el carcinoma en una etapa precoz. Como resultado, se produce una disminución en la incidencia de la enfermedad y un aumento en la probabilidad de supervivencia. Existen varios métodos recomendados en el cribado del CCR, la literatura divide las pruebas de cribado en dos tipos: basadas en pruebas estructurales y pruebas en muestras sanguíneas y/o fluidos corporales. Todos estos métodos poseen una capacidad para reducir la mortalidad del CCR cuando se realizan en los intervalos de tiempo apropiados y con un seguimiento aceptable. Ante un resultado positivo de cualquier prueba sobre muestras sanguíneas o fecales deben ser seguidos por una colonoscopia para una evaluación diagnóstica completa. Una creciente evidencia demuestra que ofrecer a los pacientes diferentes opciones de muestreo aumenta sustancialmente la adherencia a las recomendaciones de cribado.

## INTRODUCCIÓN

### 2.4.1.1. Guías de cribado

La colonoscopia y otras modalidades de detección precoz han contribuido a la disminución de las tasas de muerte por CCR a través de la identificación temprana y la eliminación de pólipos premalignos(229). Con el empleo de nuevas tecnologías y una mayor comprensión de los cambios moleculares que conducen al carcinoma, algunos métodos novedosos parecen ser prometedores en cuanto a la estratificación del riesgo de los pacientes que determinan quiénes pueden beneficiarse de pruebas de detección más invasivas(230). Es importante destacar que las recientes guías publicadas por la *US Preventive Service Task Force* (USPSTF) en junio de 2016 confirmaron que el cribado del CCR en adultos asintomáticos con riesgo medio entre las edades de 50 y 75 años es sustancialmente infrautilizado a pesar de sus beneficios demostrados(231). Además, estas guías sugieren que, aunque las estrategias de detección múltiple tienen diferentes niveles de evidencia que respaldan su utilidad, no hay datos que demuestren que una prueba selectiva proporcione un mayor beneficio real. Otras organizaciones, incluida una conjunta entre la *American Cancer Society* (ACS), *US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer* y el *American College of Radiology* (232), el *American College of Physicians* (ACP)(233) y el *American College of Gastroenterology* (ACG)(234) también han emitido guías de estrategias de prevención y detección en el CCR. Si bien todas las organizaciones recomiendan el cribado de rutina a partir de los 50 años en adultos asintomáticos de riesgo medio, los métodos de detección preferidos, intervalos de tiempo y edad para interrumpir el cribado varían según las guías adoptadas. Las similitudes y diferencias entre estas directrices se resumen en la Tabla 6. Las directrices de las diversas organizaciones también difieren con respecto a la definición de individuos de alto riesgo y las estrategias de cribado óptimas en estos pacientes.

**Tabla 6. Comparación de recomendaciones de detección precoz emitidas por diferentes organizaciones para individuos asintomáticos con riesgo medio para CCR.**

Organización	Año	Edad de inicio (años)	Edad de finalización (años)	Pruebas recomendadas e intervalos (Estructurales)	Pruebas recomendadas e intervalos (Muestras fecales)
<b>US Preventive Service Task Force</b>	2016	50	75	Colonoscopia (10 años). Sigmoidoscopia flexible (5 años) Sigmoidoscopia flexible con FIT (sigmoidoscopia 10 años y FIT 1 año) ColoTAC (5 años)	SOH (1 año) FIT (1 año) FIT con ADN fecal (1 o 3 años)
<b>American Cancer Society (ACS), US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer y American College of Radiology</b>	2008	50	No especificado	Colonoscopia (10 años). Sigmoidoscopia flexible (5 años) ColoTAC (5 años) Enema baritado doble contraste (5 años)	SOH (1 año) FIT (1 año) ADN fecal (incierto)
<b>American College of Physicians</b>	2012	50	75 o individuos con una expectativa menor de 10 años	Colonoscopia (10 años). Sigmoidoscopia flexible (5 años) ADN fecal (incierto)	SOH (1 año) FIT (1 año)
<b>American College of Gastroenterology</b>	2009	50 (45 en Afro-americanos)	No especificado	Colonoscopia (10 años). Sigmoidoscopia flexible (5 años) ColoTAC (5 años)	SOH (1 año) FIT (1 año) ADN fecal (3 años)

## INTRODUCCIÓN

### 2.4.1.2. Opciones de cribado

Como se describe a continuación y en la Tabla 7, han surgido y se encuentran disponibles numerosas modalidades de cribado: procedimientos estructurales y pruebas de laboratorio con variable sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos/negativos y coste económico. Debido a la alta sensibilidad, especificidad y la facilidad en la extirpación de pólipos, la colonoscopia sigue siendo el *Gold* estándar para el cribado en el CCR. Por lo tanto, se deduce que una limitación importante de las modalidades de detección basadas en pruebas de imágenes, muestras de heces y/o sangre es la posibilidad de un enfoque de dos pasos, donde se recomienda a los individuos con una de estas pruebas de detección positiva someterse a una colonoscopia. Esto puede dar lugar a brechas diagnósticas tempranas y la posibilidad de retrasos en el diagnóstico o a pacientes perdidos durante el seguimiento. Además, dada la baja sensibilidad de las pruebas en muestras de heces y/o sangre para detectar pólipos precancerosos comparándolas con la colonoscopia, un mayor número de estos pólipos tienen el potencial riesgo de pasar inadvertidos y sin tratamiento. Se debe informar a los pacientes sobre los riesgos y beneficios del examen de detección y sobre cómo se manejará un resultado positivo antes del examen.

Tabla 7. Características de pruebas de Cribado.

PRUEBA	MUESTRA	SENSIBILIDAD %	ESPECIFICIDAD%	COSTO
<b><i>Colonoscopia</i></b>	Anatómica	95	90	\$800-\$1000
<b><i>SOH</i></b>	Fecal	70	92,5	\$5
<b><i>FIT</i></b>	Fecal	70	95	\$22
<b><i>ColoTAC</i></b>	Imagen	89	75	\$400-\$800
<b><i>SEPT9</i></b>	Sangre	67-96	81-99	Más de \$350
<b><i>Cologuard</i></b>	Fecal	92	87	\$649



### 2.4.1.2.1. Pruebas estructurales

La **colonoscopia** ha estado ampliamente disponible desde la década de 1970, momento en que fue utilizado para la realización de polipectomías. Las guías de detección se adoptaron en la década de los 90 en base a ensayos controlados aleatorios que demostraron que el cribado del CCR con pruebas de SOH seguido de una colonoscopia en un resultado positivo se asociaba con una reducción significativa de la mortalidad relacionada con el CCR(235). Estudios observacionales demostraron una reducción del 30-60% en el riesgo y en la mortalidad del carcinoma colorrectal debido a la detección aislada por colonoscopia *versus* colonoscopia seguido de resultados positivos de SOH(236). La colonoscopia sigue siendo el cribado estándar actual en los EE. UU. para el CCR(231). Actualmente, el algoritmo de cribado más común utilizado en los EE. UU. para individuos con riesgo medio implica una colonoscopia cada 10 años en función del ciclo de crecimiento lento (10-15 años) donde la mayoría de los pólipos pequeños aumentan de tamaño y se degeneran en carcinoma(229). La disminución del intervalo de detección está indicada cuando hay antecedentes familiares de CCR o cuando se han identificado pólipos de alto riesgo(237). A pesar de la alta calidad de las guías publicadas, el cribado en los EE. UU. se limita a aproximadamente el 58% de la población en riesgo(238).

La **sigmoidoscopia flexible** también se incluye como prueba de cribado del CCR en las guías de los EE. UU., ya que se han demostrado reducciones en la incidencia y la mortalidad del carcinoma con este procedimiento(239). Cuando se utiliza como prueba de cribado, se recomienda una sigmoidoscopia flexible cada 5 años en individuos de riesgo medio. Como los beneficios de la sigmoidoscopia se limitan al colon distal, este enfoque se ha utilizado en gran medida para el cribado en los casos en que una colonoscopia completa puede no ser factible inicialmente. Dichas limitaciones técnicas pueden deberse a un carcinoma obstructivo, curvaturas extensas del colon, angulación transversal o friabilidad excesiva de la mucosa. Dado el cambio gradual del CCR del lado izquierdo al CCR del lado derecho que se ha observado consistentemente desde la década de 1960, la colonoscopia continúa dominando las modalidades de detección por vía endoscópica(240).

En los últimos años, el uso de la **colonografía por tomografía computarizada** (coloTAC) también conocida como colonoscopia virtual, ha reemplazado al enema de bario de doble contraste como alternativa de cribado radiográfico a la colonoscopia(234).

## INTRODUCCIÓN

Sin embargo, el uso de la coloTAC sigue siendo controvertida y solo es utilizado si existen contraindicaciones para otras formas más tradicionales de cribado(241). Cuando se utiliza para la detección precoz, el intervalo sugerido es de 5 años en individuos de riesgo-promedio, pero este intervalo recomendado es algo incierto debido a la falta de estudios disponibles(242). Al igual que la colonoscopia, la coloTAC requiere limpieza intestinal y distensión del colon para un estudio óptimo. El procedimiento en sí es relativamente rápido, bien tolerado, y no requiere anestesia ni un período de recuperación posterior al procedimiento. La dosis de radiación es de aproximadamente 4-5 mSv (para referencia, una radiografía de tórax de 2 vistas es aproximadamente 0.1 mSv), que puede reducirse aún más utilizando protocolos optimizados para disminuir la exposición a la radiación(243). Desafortunadamente, la coloTAC no permite de forma simultánea la eliminación de pólipos o la determinación de la naturaleza histológica de una lesión y los hallazgos de la coloTAC falsamente positivos/negativos pueden ser el resultado de la obtención de material residual y/o distensión insuficiente. También es importante señalar que los hallazgos extracolónicos, la mayoría de los cuales son benignos y clínicamente no significativos, tienden a agregar costos innecesarios de atención médica, aunque también pueden detectarse lesiones clínicamente significativas en etapas más tempranas y tratables(243). Los estudios han demostrado una sensibilidad y especificidad mixtas para lesiones pequeñas (<5 mm) en comparación con lesiones mayores (> 9 mm)(241). En general, la exactitud de la detección de pólipos mediante coloTAC mejora con el aumento del tamaño de la lesión y es comparable con la colonoscopia tradicional para pólipos de 10 mm o de mayor tamaño. Sin embargo, la detección de pólipos planos y aquellos de menos de 10 mm por coloTAC es inferior y debe considerarse al sopesar las opciones de cribado(242).

### **2.4.1.2.2. Pruebas de Laboratorio**

Las pruebas anuales o bianuales de SOH y las pruebas inmunoquímicas fecales (FIT) están ampliamente disponibles y se utilizan con frecuencia para el cribado del CCR. Estas pruebas identifican a las personas en riesgo en función de la presencia de sangre microscópica en las heces y se consideran muy rentables en comparación de la colonoscopia (Tabla 7). El tejido polipoide tiende a ser más friables y, por lo tanto, sangran más fácilmente que la mucosa colónica normal, por lo que la detección mediante esta prueba es un método de detección viable. SOH y FIT se basan en diferentes principios

analíticos, SOH detecta indirectamente la sangre a través de la oxidación no específica de guayaco mediada por peróxido que puede, en algunos casos, verse afectada por la dieta y/o productos químicos. Por el contrario, la FIT utiliza un anticuerpo antiglobina específico para la detección de hemoglobina humana(244). Por lo tanto, se deduce que el cribado con FIT tiene una sensibilidad y especificidad superiores en comparación con SOH debido al uso de anticuerpos de globina específicos para humanos que no se ven afectados por la dieta o los medicamentos(245). Además, aunque las pruebas consecutivas de SOH múltiples aumentan su sensibilidad, solo se requiere de una muestra para el cribado mediante FIT. La efectividad del cribado mediante muestras fecales se ha demostrado en ensayos aleatorizados(236), llegando a la conclusión que en poblaciones donde la colonoscopia está subutilizada, las pruebas alternativas reducen la mortalidad por CCR(246). Las pruebas de detección basadas en muestras fecales han sido criticadas por su baja sensibilidad a pesar de su especificidad relativamente alta causando preocupación en el campo legal en el contexto de lesiones no indentificadas(247). Como resultado, la adopción de SOH o FIT como pruebas principales de cribado en la población han sido limitada en los EE. UU. Varios países (incluidas Australia, Canadá, Francia y España) con una capacidad insuficiente o una baja aceptación de la colonoscopia, utilizan estas pruebas de detección precoz y varios dependen de estas pruebas de forma exclusiva para el cribado. Es importante tener en cuenta que la falta de disponibilidad o aceptación (a diferencia del ahorro de costes económicos) impulsa los programas de detección en muestras fecales. La evidencia reciente sugiere que la colonoscopia en comparación con una prueba FIT inicial es un método más coste-efectivo para el cribado de adenoma, neoplasia avanzada y un punto final compuesto de neoplasia avanzada o estadio I del CCR(248).

### **2.4.1.2.3. Pruebas Genéticas**

Las alteraciones genéticas y epigenéticas contribuyen al CCR. Como se describe a continuación, los objetivos de detección de los nuevos métodos de cribado molecular del carcinoma incluyen proteínas anormales o expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), mutaciones génicas o genes metilados aberrantes presentes en muestras fecales o fluidos corporales. Estas pruebas se basan en hallazgos específicos como la identificación de MSI e islotes de CpG hipermetiladas en regiones de genes promotoras que facilitan la tumorigénesis de diversos cánceres, incluido el CCR(249). Han surgido

## INTRODUCCIÓN

nuevas modalidades moleculares basadas en alteraciones genéticas y epigenéticas y están logrando un cambio en el enfoque de cribado del CCR. En octubre de 2014, el *Centers for Medicare and Medicaid Services* anunció que invertiría en la primera prueba en muestras fecales no invasiva de ADN, aprobada por la Food and Drug Administration (FDA), el *Exact Sciences FIT-DNA (Cologuard®)* para pacientes de riesgo medio. Esta prueba evalúa la presencia de sangre (ensayo inmunoquímico en hemoglobina humana) y el ADN de las células que se descaman de pólipos o de tejido tumoral (regiones promotoras en genes aberrantemente metiladas BMP3 y NFRG4, mutaciones *KRAS* y la expresión de B-actina) en una muestra de heces de un paciente con sospecha de presentar pólipos precancerosos o cancerosos. Actualmente, **Cologuard®** se recomienda cada 3 años en individuos de riesgo promedio que cumplan parámetros de detección precoz (250). Las ventajas de la prueba incluyen evitar la preparación intestinal, la realización domiciliar sin pérdida de tiempo laboral y la ausencia de complicaciones relacionadas con el procedimiento. El coste económico de **Cologuard®** aunque es más alto que el de FIT o SOH, sigue siendo menor que la colonoscopia (Tabla 7). Además, esta prueba multidireccional ha demostrado tener una sensibilidad más alta que FIT(251) que está a la par con la colonoscopia en la detección del CCR. A medida que el número de compañías de seguros privadas acepten esta alternativa de cribado seguirá expandiéndose, esta nueva modalidad probablemente se integre en un nuevo algoritmo de detección precoz coste-efectivo.

Varias pruebas moleculares basadas en muestras sanguíneas también están disponibles en los EU, incluyendo *Quest Diagnostic's ColoVantage*, *Abbott's mS9*, *Epi's ProColon* y *GeneNews ColonSentry*. Las pruebas *ColoVantage*, *mS9* y *proColon* están basados en el gen *SEPT9*. El producto del gen *SEPT9* da lugar a la proteína Septin implicada en la citocinesis, que a su vez expone una metilación aberrante de su región promotora en el tejido del CCR en comparación con el tejido de la mucosa colónica normal(252). Aunque las pruebas originales basadas en *SEPT9* tienen una sensibilidad menor en comparación con **Cologuard®**, las pruebas de nueva generación como *proColon 2.0* tienen protocolos optimizados de la reacción en cadena de la polimerasa consiguiendo una mayor sensibilidad. Cabe destacar que, en abril de 2016, *Epi's ProColon* fue la primera prueba de muestra sanguínea aprobada por la FDA para el cribado de CCR(231). Por otro lado, *ColonSentry* se basa en un panel de 7 genes que podrían reflejar alteraciones sutiles en la expresión génica periférica en respuesta a la enfermedad en lugar de servir como biomarcadores directos del tumor(253). La sensibilidad de la prueba *ColonSentry* es

similar a la observada para las pruebas SEPT9 de primera generación. Como se muestra en la Tabla 7, las sensibilidades de estas pruebas basadas en sangre son más bajas que las de **Cologuard®** o la colonoscopia(254).

- **ADN y ARN fecal**

El conocimiento del genoma ha llevado a la exploración de nuevos métodos para el estudio del CCR con la mayoría de los genes implicados: *APC*, *p53* y *KRAS*. Además, la hipermetilación de los genes supresores de los promotores es un evento temprano en la carcinogénesis, detectable en la mayoría de los CCR, aunque este fenómeno no es universal. Por lo tanto, el diseño de genética y epigenética de marcadores capaces de dar máxima cobertura en el diagnóstico de esta neoplasia parece una razonable estrategia para su detección precoz. Estas pruebas moleculares no son invasivas. Sólo el 0,01% de las pruebas de ADN fecal total (sADN) es humano ya que, el resto, proviene de la dieta y la flora bacteriana. Además, el ADN del tumor es un pequeño porcentaje de todo el ADN humano y es aún más pequeño en el caso de los AA. Esto implica que las técnicas de detección de marcadores deben exhibir una alta sensibilidad. Las primeras pruebas de ADN que se investigaron fueron las mutaciones en *KRAS* en pacientes con CCR. Un ensayo que comparó la prueba de ADN con la prueba de gSOH(255) obtuvo una sensibilidad en detección de AA del 46% y del 16%, respectivamente. Aunque el gen de *APC* y *TP53* están mutados en la mayoría de los CCR, éstas se distribuyen a través de cientos de posiciones, por lo que, el análisis mutacional no es viable para ensayos en la práctica clínica. La sensibilidad para la detección del adenoma aumenta con el tamaño de la lesión, aunque las lesiones de pólipos serrados también pueden ser detectadas por estos marcadores de ADN(256). Al contrario que la prueba de SOH, en el que una de las limitaciones es su menor sensibilidad para lesiones proximales, al igual que ocurre con la colonoscopia, las pruebas de ADN no se ven afectadas por la ubicación de la neoplasia. Su principal desventaja es su elevado coste. La sensibilidad global para la detección de CCR se estima entre el 62% y el 91%. En la actualidad, la prueba de detección de ADN en heces no se considera una modalidad de cribado primario. Los niveles de expresión de ARN en las heces también pueden ser cuantificados para identificar pacientes con CCR con una sensibilidad aproximada del 87% y una especificidad del 100% (Binefa et al., 2014). Los microRNAs (miRNAs o MIR) son pequeñas moléculas de ARN de 18 a 22 nucleótidos que regulan el gen expresión a nivel post-transcripcional. El CCR presenta

## INTRODUCCIÓN

un único patrón identificable de la expresión de los genes miARN, que puede ser detectado en las heces para su diagnóstico precoz.

- **Detección sanguínea de células y/o marcadores tumorales**

La detección en sangre/plasma de las células tumorales podría ser de valor pronóstico, pero no son útiles en el contexto del CCCR. Por otra parte, la presencia de ácidos nucleicos libres de origen tumoral en plasma ha sido documentada. Como una alternativa al análisis de mutación, en la detección de cambios epigenéticos en el plasma se evaluó la hipermetilación del gen que pertenece a una clase de guanosina trifosfatasa, la Septina 9, asociada con el CCR. El análisis de metilación de la Septina 9 (mSept 9) en el plasma encontrado entre el 58% y el 96% de los pacientes con CCR y el 18% de los pacientes con AA, tiene una especificidad del 86% y del 100%, respectivamente, una sensibilidad del 82.1%, un valor predictivo negativo del 99.9% y un valor predictivo positivo del 51%. En cuanto al ARN en el plasma, el transcriptoma de la sangre periférica y plasma proporciona una fuente potencial de diagnóstico de marcadores tumorales como BANK1, BCNP1, CDA, MGC20553 y MS4A1. Sobre las proteínas en el plasma, el antígeno carcinoembrionario (CEA) es la proteína más investigada, pero no es útil en el CCCR debido a su baja sensibilidad: entre el 43% y el 69%. Otros antígenos, como CA 19.9, CA 50, CA 72.4, CO 29.11, se han estudiado sin demostrar aceptable rendimiento en el diagnóstico precoz. Entre otras proteínas, las más destacadas para la detección del CCR incluyen el CD26 (sensibilidad del 90% y especificidad del 90%), la alfa-defensina 1 (sensibilidad del 69% y especificidad del 100%), el antígeno específico del cáncer de colon, CCSA-3 y CCSA-4, (sensibilidad del 100% y especificidad 96%; para la detección de los AA la sensibilidad es de 78%), CCSA-2 (sensibilidad del 89% y especificidad del 84% para el CCR; para los AA la sensibilidad es del 20%); y TIMP-1 (sensibilidad del 60% y especificidad del 98%). Los Linfocitos CD24 circulantes también tienen la posibilidad de detectar lesiones displásicas de AA y el CCR. Otra área de investigación es la identificación de autoanticuerpos asociados a tumores como marcadores de CCR: p53, p62, topoisomerasa II-alfa, histona deacetilasa 3 y 5, ubiquitina carboxihidrolasa L3 (UCHL3), tirosinasa, tropomiosina y ciclina B. Estos marcadores están ausentes en los individuos sanos y sugieren una vía prometedora para investigación.

- **Detección urinaria de marcadores tumorales**

La detección de la hipermetilación del gen de la vicentina en muestras de orina fue asociada significativamente con el CCR. La utilización de SELDI-TOF y las plataformas de MALDI-TOF MS para identificar los perfiles de proteínas en la orina de pacientes con CCR han sido evaluadas con una sensibilidad del 78% y una especificidad del 87%.

### **2.4.1.3. Cribado en pacientes de alto riesgo**

Entre los muchos métodos e intervalos de detección aceptados, la mayoría se consideran apropiados para pacientes con riesgo medio. Aproximadamente el 70% del CCR se considera esporádico o por riesgo medio y tiene una edad media de inicio de 69 años. Mientras que el riesgo de cáncer de colon a lo largo de la vida es de aproximadamente 5%, las personas con 1 pariente en primer grado afectado tienen un riesgo de 2 a 3 veces mayor y las personas con 2 familiares en primer grado afectados tienen un aumento en 3 a 4 veces más(257). Las definiciones de riesgo aumentado o de alto riesgo basados en los antecedentes personales, antecedentes familiares y/o genéticos difieren sutilmente en diferentes guías y se resumen en la Tabla 8. Las guías ACG recomiendan utilizar la colonoscopia en pacientes con riesgo aumentado y alto riesgo como método de cribado ya que los resultados negativos de pruebas alternativas no son suficientes para omitir la necesidad de una colonoscopia debido a la alta probabilidad de aparición de enfermedad antes de la prueba. En general, las guías de ACG también sugieren que el cribado debe realizarse cada 5 años a partir de los 40 o 10 años menos de la edad del familiar con el diagnóstico más temprano. El resto de CCR se produce en individuos de alto riesgo con síndromes genéticos o con enfermedad inflamatoria intestinal. Entidades específicas que transmiten un aumento del riesgo genético son: PAF (junto con el síndrome de Gardner y el síndrome de Turcot), Síndrome de Lynch, JPS, Síndrome de Peutz-Jeghers, y PAM(258). Como se resume en la Tabla 9, los pacientes afectados con estos los síndromes requieren ajustes adicionales en los cronogramas de cribado, incluidos exámenes más frecuentes y tempranos.

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 8. Descripciones de población en riesgo**

Organización	Descripción Pacientes con riesgo medio/alto	Descripción adicional
<b>US Preventive Service Task Force</b>	Antecedentes familiares de CCR (un pariente de primer grado con CCR de inicio precoz o múltiples familiares de primer grado con CCR)	Edad avanzada, sexo masculino y raza afroamericana con mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal
<b>American Cancer Society (ACS), US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer y American College of Radiology</b>	Antecedentes familiares de CCR, pólipos o síndrome hereditario de CCR; antecedentes personales de CCR, enfermedad inflamatoria intestinal crónica (colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn)	
<b>American College of Physicians</b>	Los factores de riesgo incluyen edad, raza afroamericana, antecedentes familiares de CCR, pólipos o síndrome de CCR hereditario (especialmente antes de los 50 años)	Los médicos deben realizar una evaluación de riesgos individualizada para determinar cuándo comenzar la detección
<b>American College of Gastroenterology</b>	Pacientes con un único familiar de primer grado diagnosticado con CCR o adenoma avanzado antes de los 60 años o con 2 familiares de primer grado con CCR o adenomas avanzados.	Los pacientes con un único familiar de primer grado diagnosticado con CCR o adenoma avanzado a la edad de 60 años o más se consideran de riesgo promedio

### 2.4.1.4. Estrategias para superar barreras de cribado

A pesar de la evidencia que apoya la efectividad del cribado en el CCR y la disponibilidad de una variedad importante de pruebas de detección, la utilización del cribado para CCR sigue siendo menor en comparación con el cáncer de mama y de cervix(259). La utilización de los métodos de cribado está influenciada tanto por factores poblacionales como individuales. Las barreras son más comunes entre las personas con menos recursos económicos, lo que resulta en disparidades en la prevalencia de la enfermedad. Las investigaciones sugieren que las causas de las disparidades de cribado difieren entre las



minorías raciales y étnicas, lo que requiere intervenciones específicas dirigidas a resolver estas brechas(260). Las políticas públicas y los proveedores de servicios de salud juegan un rol importante en el alcance de las pruebas de cribado. Los desafíos relacionados con la detección precoz incluyen una fuente de atención habitual, cobertura de seguro inadecuada, falta de recomendación del proveedor, factores logísticos (por ejemplo, transporte, programación y lenguaje), el temor y falta de conocimiento(261). Afortunadamente, existen estrategias para ayudar superar muchas de estas barreras. El objetivo de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades y su Programa de Control del Cáncer Colorrectal fue incrementar la detección precoz del CCR a nivel poblacional, especialmente entre individuos de bajos ingresos, sin seguro médico y en ciertos grupos raciales y étnicos, usando estrategias basadas en evidencia.

La prevalencia de uso del cribado en el CCR aumenta cuando se ofrece a los pacientes una variedad de pruebas válidas(262). Además, el envío directo de paquetes para SOH o FIT a personas específicas para el cribado ayuda a limitar algunas barreras logísticas. En una escala más amplia, las disposiciones de la Ley de Protección al Paciente y Asistencia Asequible han ayudado a reducir las barreras relacionadas con el costo y el acceso a la detección del CCR reduciendo el número de personas sin seguro y reduciendo o eliminando los costos de investigación para aquellos que sí cuentan con seguro médico.

**Tabla 9. Cronograma de detección precoz en síndromes de CCR**

Síndrome	Mutación Genética	Descripción	Edad de inicio de detección precoz recomendada	Prueba de cribado e intervalo recomendado
<b>FAP</b>	<b>Tumor supresor APC</b>	Desarrollo de numerosos pólipos en la adolescencia; la edad promedio de inicio del CCR es de 39 años; riesgo de CCR se acerca al 100% a los 45 años	10-12	Colonoscopia o sigmoidoscopia flexible (1 año)

## INTRODUCCIÓN

<b>Síndrome de Lynch</b>	<b>Genes MMR (LH1, MSH2, MMSH6 o PMS2)</b>	La forma más común de CRC heredado; los tumores exhiben inestabilidad de microsatélites; El riesgo de CRC durante la vida es del 80%	20-25 o 10 años menos que el caso familiar mas precoz	Colonoscopia (1-2 años)
<b>MAP</b>	<b>Gen MUTYH</b>	Se encuentra con mayor frecuencia en pacientes que presentan de 20 a 99 adenomas; El riesgo de CRC durante la vida en los portadores bialélicos es del 70% -75%	25-30	Colonoscopia (1-2 años)
<b>SPJ</b>	<b>Genes supresores SMAD4 o DMPR1A</b>	Desarrollo de docenas a muchos cientos de pólipos juveniles en estómago, intestino, colon y recto; generalmente diagnosticado en las primeras 2 décadas de vida; riesgo de CCR se aproxima al 68% a los 68 años	12	Colonoscopia (1-3 años)
<b>Síndrome Peutz-Jeghers</b>	<b>Gen STK11</b>	Definido por pólipos hamartomatosos distintos y pigmentación mucosa y cutánea característica; El riesgo de CRC de por vida es 39%	8	Colonoscopia (depende de hallazgos iniciales)
<b>Síndrome de Poliposis Hereditaria Mixta</b>	<b>Desconocido</b>	Originalmente descrito en la gran familia judía Ashkenazi; los individuos afectados exhiben varios tipos diferentes de pólipos y adenocarcinomas; la edad media de ocurrencia de pólipos es de 28 años	20	Colonoscopia (1-2 años)
<b>Poliposis Serrada</b>	<b>Desconocido</b>	Predisposición a pólipos serrados y 20 Desarrollo de colonoscopia de CRC; el riesgo estimado de por vida (1-2 años) de CRC es > 50%	20	Colonoscopia (1-2 años)

### 2.4.2. Diagnóstico Molecular

En el caso del CCR, en los pacientes que presentan ciertas mutaciones en el gen *KRAS*, asociado a la activación de la vía de señalización intracelular a través del EGFR, el diagnóstico molecular de dichas mutaciones permite identificar quienes podrían beneficiarse del tratamiento mediante anticuerpos contra el EGFR(263).

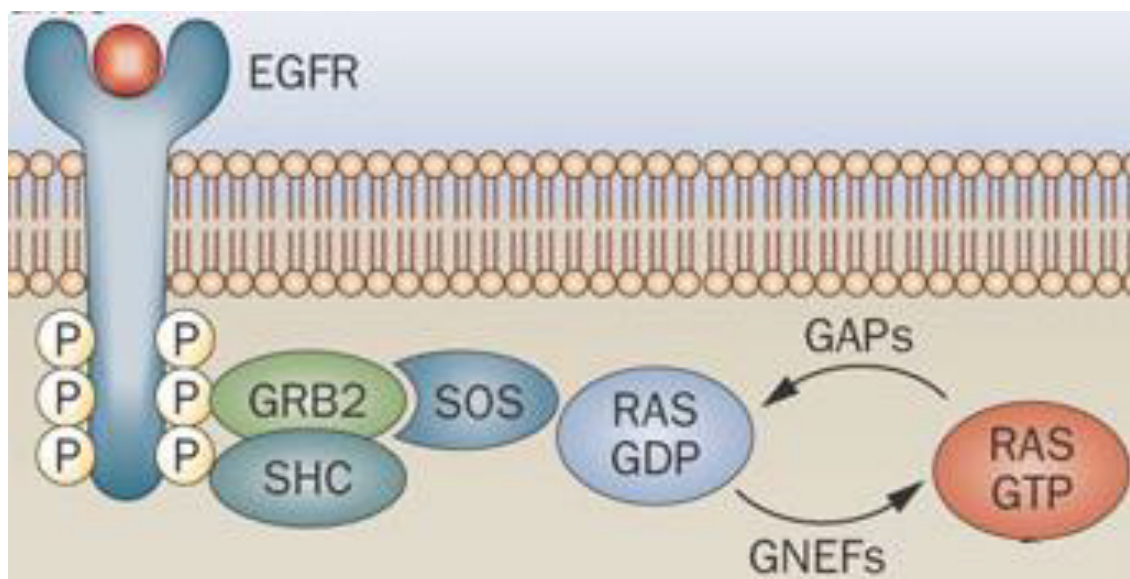


Figura 12. Esquema de actuación de la proteínas *KRAS* a través de la señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) (264).

- **La Reacción en Cadena de la Polimerasa**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación de una región específica de ADN utilizando partidores o secuencias de ADN delimitando dicha zona de amplificación. A partir de una copia de la región a amplificar se obtienen millones de copias, lo que permite su detección y de esta forma evidenciar la presencia de la región de ADN en una muestra determinada. Dada la naturaleza de la técnica, la alta especificidad de la PCR es debida a la hibridación de los partidores complementarios a la secuencia blanco y su elevada sensibilidad a la baja cantidad de ADN que se requiere para iniciar la amplificación. Desde su creación, se han descrito variantes de la PCR que han optimizado el diagnóstico clínico como las técnicas de PCR múltiple o PCR a tiempo real (Tabla 10).

## INTRODUCCIÓN

Tabla 10. Tipos de PCR, características y aplicaciones.

Tipo de PCR	Características	Aplicaciones
<b>PCR Estándar</b>	Amplificación de un segmento de ADN utilizando dos partidores	Detección cualitativa de un segmento de ADN
<b>PCR Múltiple</b>	Amplificación de 2 o más segmentos de ADN utilizando varios partidores en una sola reacción de amplificación. La detección de la amplificación es mediante geles de agarosa	Detección cualitativa de varios segmentos de ADN en una sola reacción de PCR.
<b>PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphisms)</b>	PCR estándar con paso de digestión mediante enzimas de restricción.	Detección de polimorfismos genéticos (SNPs)
<b>RT (Reverse transcriptase)-PCR</b>	Síntesis de cADN a partir de ARN mediante transcripción reversa, seguido de PCR.	Expresión de genes. Detección de virus ARN
<b>PCR-RT (Real time) o qPCR</b>	PCR estándar utilizando tinciones o sondas con fluoróforos para la detección de los fragmentos amplificados. Puede ser del tipo Multiplex.	Detección cualitativa de uno o varios segmentos de ADN. Cuantificación de ADN en la muestra o expresión de genes.

### 2.4.2.1. Mutaciones del gen *KRAS*

El gen *KRAS* (homólogo del oncogén viral del sarcoma de la rata Kristen) está localizado en el brazo corto del cromosoma 12p12.1, el cual codifica la proteína KRAS de 189 aminoácidos. Según datos recogidos por el *Catalogue of Somatic mutations in Cancer* (COSMIC) se describe una frecuencia del 34% de mutaciones en muestras de CCR (Figura 13). Dentro de estas mutaciones, alrededor del 80% corresponden a sustituciones nucleotídicas las cuales producen aminoácidos diferentes y en consecuencia una proteína alterada y sin actividad GTPasa. Entre estas sustituciones nucleotídicas, encontramos a las mutaciones *nonsense* (sin sentido) en la primera base del codón 12: c.35G>A, c.35G>T y en el codon 13: c.38G>A como las más predominantes. La variedad de

mutaciones concretas en diversas posiciones en los codones 12 y 13 mantienen a la proteína KRAS constitutivamente activa, jugando un papel importante como biomarcador predictivo en la práctica de la oncología médica. Es así que el análisis de esta mutación se emplea como predictor de la respuesta al tratamiento con anti-EGFR como el cetuximab o el panituximab indicada en los pacientes con CCR metastásico (CCRM)(265) y es capaz de proporcionar información sobre la progresión tumoral y la SG(266).

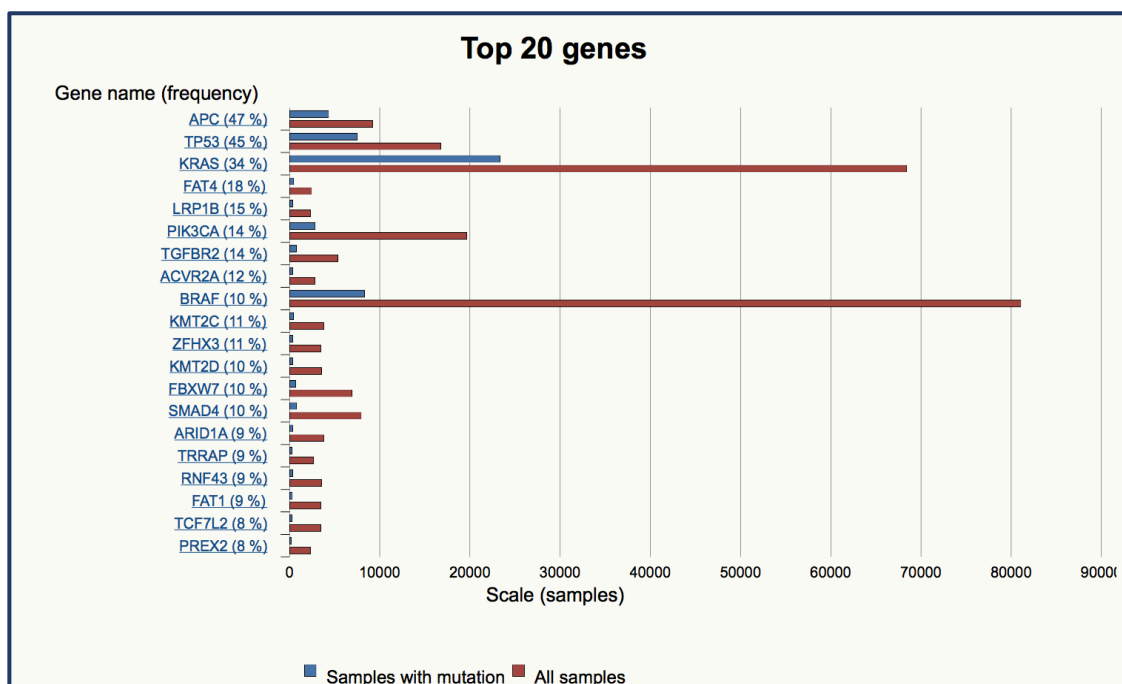


Figura 13. Porcentaje de mutaciones genéticas en carcinomas de colon y recto (COSMIC v84, 2018).

Las mutaciones más frecuentes en el gen *KRAS* se producen principalmente en los residuos G12 y G13, aunque en este último con menor frecuencia. En la Figura 14 se muestra la distribución de frecuencia según el tipo de mutación producido en los codones 12 y 13. Las mutaciones más frecuentes en el codón 12 son: G12D con un 35%, seguida de G12V con un 24% y G12C con un 12%. En el codón 13 solo destaca la G13D con una frecuencia del 13%.

## INTRODUCCIÓN

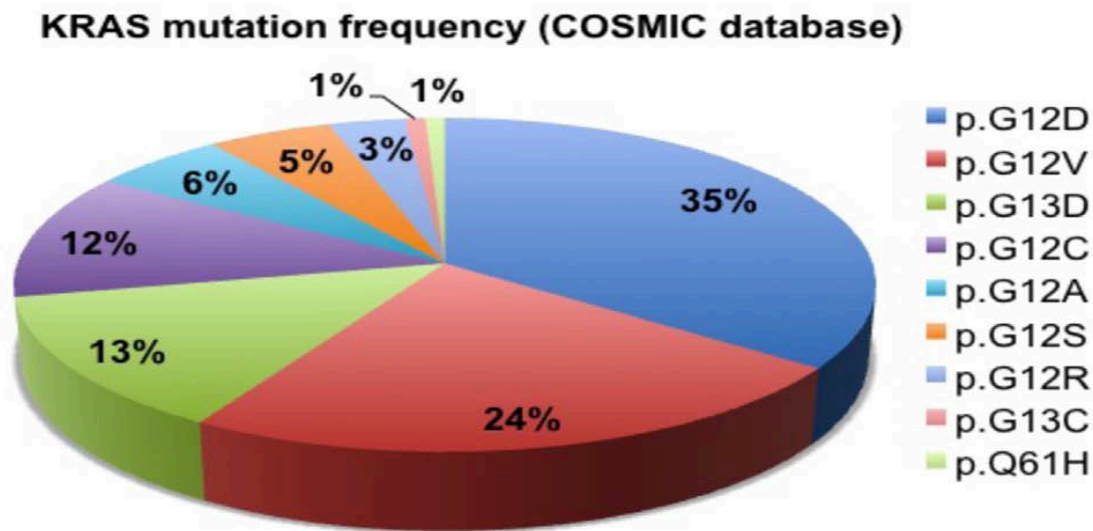


Figura 14. Frecuencia de mutaciones *KRAS* (COSMIC v84, 2018).

- **Implicaciones clínicas**

Las vías de señalización del EGFR están implicadas en el control de la supervivencia celular, progresión del ciclo celular, angiogénesis, migración celular e invasión metastásica, por lo que una de las terapias oncológicas es el bloqueo de este receptor. Con este fin, se emplean anticuerpos monoclonales cuya diana molecular es la porción externa del receptor EGFR (Figura 15), como son cetuximab y panituximab, que impiden que este receptor sea activado. La proteína *KRAS* realiza su función en la cascada de transducción a partir del receptor EGFR. La unión de GTP a *KRAS*, produce un cambio conformacional en la proteína permitiendo que actúe sobre más de 20 efectores, los cuales intervienen en numerosos acontecimientos como son la supresión de la apoptosis, la estimulación del crecimiento celular, angiogénesis, migración y diferenciación(267). *KRAS* se encuentra en estado activo cuando está unido a GTP y se encuentra en estado inactivo al estar ligado a GDP. La unión de GTP a *KRAS* es promovida por las proteínas factores de intercambio del nucleótido guanina, mientras que *KRAS* posee actividad GTPasa intrínseca. Las mutaciones sobre el gen *KRAS*, sobre todo en los codones 12, 13 y 61, disminuyen la actividad GTPasa intrínseca de *KRAS*, lo cual resulta en una activación constitutiva del mismo(266). Debido a que *KRAS* actúa por debajo del

receptor EGFR en la cascada, las terapias anti-EGFR resultan ineficaces para aquellos individuos que posean mutaciones que hacen que permanezca la proteína KRAS activa. En diversos estudios se ha demostrado que el estado de la mutación de *KRAS* es predictivo para la respuesta a cetuximab(268), así como para panitumumab(269).

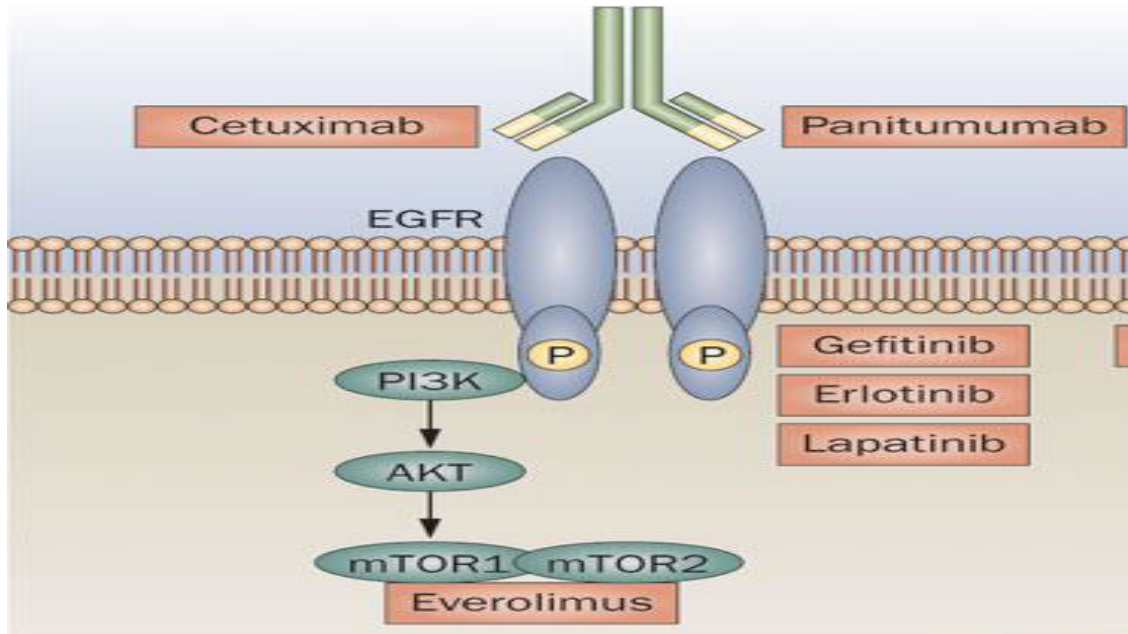


Figura 15. Esquema de bloqueo de la región extracelular de EGFR por parte de cetuximab y panitumumab (264).

### 2.4.2.2. Técnicas de identificación de la mutación *KRAS*

Estudios recientes han demostrado que además de las mutaciones en los codones 12 y 13, las mutaciones en los codones 19, 61, 117, 146 y 164 son de gran interés ya que también podrían tener influencia en la respuesta al tratamiento con anti-EGFR(270), por lo que es importante poseer análisis clínicos que sean fiables, rápidos y económicos para la detección de estas mutaciones. Más de 60 tecnologías han sido utilizadas para el análisis genético de *KRAS*, la mayoría de ellas se pueden clasificar dentro de las categorías de secuenciación, análisis de alta resolución de fusión (HRM), polimorfismos en la conformación de hebras monocatenarias (SSCP), electroforesis en gel gradiente desnaturizante (DGGE), cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante (dHPLC), SNaPshot, análisis mediante micromatrices y PCR alelo específica, así como

## INTRODUCCIÓN

una serie de paquetes comerciales aprobados para el diagnóstico in vitro. Todas estas técnicas se han aplicado en el análisis clínico de *KRAS*, cada una posee sus propias características, con sus ventajas y desventajas(271).

### 2.4.2.2.1. Secuenciación

- **Método Sanger**

El método de secuenciación por Sanger, es un método comúnmente utilizado en el análisis de mutación del gen *KRAS*. De hecho, muchos investigadores la consideran como la técnica *gold standard*, debido a su capacidad de identificar la totalidad de pares de bases mutados, por lo que es ampliamente utilizada para confirmar los resultados obtenidos mediante otras pruebas como las técnicas de barrido, las cuales no pueden identificar los cambios en las bases específicas(272). No obstante, su límite de detección es relativamente modesto comparado con otras técnicas de análisis. Diversos estudios han demostrado que la secuenciación por Sanger requiere al menos que el 15-50 % de la muestra de ADN presente la mutación *KRAS* para una detección positiva fiable, lo cual es insuficiente para muestras clínicas con bajos niveles de células tumorales o de ADN(273). Se ha demostrado que este método posee menos sensibilidad en la detección de sustituciones en bases de la primera posición del codon 12 comparado con otras sustituciones(271).

- **Pirosecuenciación**

Los ensayos de pirosecuenciación están diseñados para detectar todas las mutaciones dentro de codones específicos del gen *KRAS*. El proceso implica extraer primero el ADN de la muestra y amplificarlo mediante PCR. Su mayor limitación es la capacidad de secuenciación, ya que sólo es capaz de secuenciar un máximo aproximado de 40 a 50 bases, además presenta dificultades en realizar medidas precisas en repeticiones de homopolímeros mayores de 5 nucleótidos. Diferentes laboratorios pueden usar cebadores ligeramente diferentes en la amplificación, pero la metodología subyacente sigue siendo la misma. Una variedad de estudios ha demostrado que el límite de detección mediante esta técnica se encuentra aproximadamente entre el 1,25 % y el 6 % de ADN mutante(274).



- **Secuenciación *Next generation***

La llegada de las técnicas de secuenciación *next generation* (SNG) ha conseguido mejorar el límite de detección de las técnicas de secuenciación hasta un 1-5 %, permitiendo el screening de un gran número de pacientes a partir de una cantidad de ADN limitada(274). Sin embargo, debido a que se usan algoritmos específicos para valorar la calidad de cada lectura alineando la secuencia con un genoma de referencia y, consecuentemente perdiendo la detección de algunas mutaciones, aún se requiere de controles internos para valorar su reproducibilidad y darle una validación clara a este procedimiento. En general los métodos de secuenciación ofrecen resultados modestos, son tecnologías que carecen de suficiente sensibilidad para algunas muestras clínicas y requieren elevados tiempos de procesamiento (274). Existen estudios que se han enfocado en mejorar esta sensibilidad, pero todavía no alcanzan los niveles conseguidos mediante técnicas de micromatrices de ADN o análisis de PCR alelo-específica(271).

#### **2.4.2.2.2. Técnicas de Barrido**

- **Análisis de alta resolución de fusión**

Los métodos basados en HRM se han utilizado en el análisis de la mutación *KRAS*. Esta técnica se basa principalmente en la detección de mutaciones o polimorfismos en dobles cadenas de ADN, mediante el aumento de la temperatura y el uso de un fluoróforo que se intercala en las dobles cadenas, éstas se van desnaturalizando y por tanto la fluorescencia emitida se reduce, generando una curva de desnaturalización específica para cada secuencia de ADN(275). El límite de detección de esta técnica está en el rango de 3 al 10 % de ADN mutante en presencia ADN nativo. HRM es un método post-PCR y ampliamente utilizado ya que es rápido, con una buena relación coste/efectividad y una elevada sensibilidad. Por ello, es una técnica recomendada para análisis de alto rendimiento. Para muestras de tejidos fijados en formalina embebidos en parafina, HRM ha mostrado una sensibilidad y especificidad del 88 % y 80 % respectivamente(271). Sin embargo, en otros estudios mostraron una especificidad del 61 % (275), ya que resulta una técnica fiable cuando se usa ADN genómico, pero presenta grandes dificultades al trabajar con muestras de tejido. Debido a que no proporciona información sobre la mutación, y a la baja fiabilidad a la hora de analizar muestras de tejidos, se recomienda que los resultados positivos de HRM sean confirmados mediante secuenciación o mediante análisis por PCR alelo-específica.

## INTRODUCCIÓN

- **Polimorfismos en la conformación de hebras monocatenarias/ electroforesis en gel gradiente desnaturalizante**

Las metodologías basadas en migración en gel de electroforesis como son los SSCP y la DGGE, son menos empleados que otros métodos para el análisis del gen *KRAS*. Mediante SSCP, se identifica el ADN mutante por la distinta capacidad de formar estructuras secundarias y terciarias por parte del ADN de simple cadena mutante, mostrando un diferente patrón de migración en el gel de electroforesis comparado con el nativo. Mientras que en el método DGGE, el ADN tanto mutante como nativo, se someten al gel de electroforesis con condiciones de desnaturalización débiles, en las que el ADN con mutaciones adopta conformaciones tridimensionales más complejas, resultando en una diferente migración en el gel. Mediante estas tecnologías, la eficiencia en la detección disminuye al incrementar el tamaño del amplicón, siendo muy difícil de realizar para tamaños superiores a 200 bp e imposible para amplicones mayores a 300 bp. Además, como la técnica HRM, SSCP y DGGE no pueden identificar las bases mutadas, por lo que más aún sus resultados deben ser confirmados (271).

- **Cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante**

La dHPLC se trata de una técnica post-PCR, en la que los productos amplificados (ADN mutante y nativo) son separados físicamente debido a las diferencias en sus tiempos de retención en columnas de policarbonato. Su límite de detección puede alcanzar hasta el 1%, aunque depende directamente de su optimización(271). Esta técnica requiere varios pasos durante el proceso y presenta una capacidad limitada de separación electroforética entre los alelos mutantes y nativos.

### 2.4.2.2.3. Técnicas basadas en PCR a tiempo real

El término ‘a tiempo real’ hace referencia a la detección de los productos amplificados en cada ciclo de la reacción. Los componentes de la mezcla de reacción son los mismos

que los de la PCR convencional, excepto el reportero, el cual permite la monitorización de los productos amplificados. Estos sistemas basados en reporteros fluorescentes pueden ser específicos (sondas TaqMan®) y no específicos (SYBR Green). El intercalante SYBR Green presenta afinidad por las dobles cadenas de ADN, y al oxidarse genera una señal

fluorescente. Es muy empleado debido a su bajo coste, aunque puede intercarse en cualquier molécula de doble cadena presente en la reacción, como por ejemplo dímeros de cebadores, y dar resultados inespecíficos. En cuanto a los métodos específicos, éstos siguen el principio de ‘transferencia de energía de resonancia fluorescente’ o FRET para generar la señal. Esta metodología consiste básicamente en la transferencia de energía de un donador o reportero fluorescente a un aceptor o ‘*quencher*’, unidos a una sonda (generalmente TaqMan®) que hibrida específicamente a la secuencia diana. Cuando se produce la hibridación, la Taq polimerasa que sintetiza la nueva hebra rompe la unión entre el reportero y el *quencher* de forma que el reportero emite fluorescencia detectada por el equipo. El empleo de la PCR a tiempo real con sondas TaqMan® presenta una selectividad entorno al 1% para el alelo mutado(276). Se han desarrollado metodologías que emplean la PCR a tiempo real en combinación con otras, como el sistema de amplificación refractaria de mutaciones con sondas Scorpion® (*SCORPION-ARMS*). Los ARMS son cebadores diseñados específicamente para hibridar con la secuencia mutante y permitir su amplificación. La detección de estas secuencias amplificadas se lleva a cabo usando los oligonucleótidos bifuncionales denominados *Scorpions*. Éstos, contienen un cebador de PCR unido covalentemente a una secuencia bloqueante que a su vez se acopla a una sonda fluorescente de secuencia complementaria/específica a la secuencia mutante, todo ello formando una estructura de horquilla. En el extremo 5’ de la sonda hay un fluoróforo unido que interacciona con el *quencher*, presente en el extremo 3’ para impedir la fluorescencia por cercanía física. Durante la PCR, cuando tiene lugar el paso de desnaturalización, se abre la horquilla y la sonda se une al amplicón, produciéndose el aumento de la señal fluorescente (el *quencher* queda alejado del fluoróforo). La secuencia de la sonda no actúa como cebador gracias al bloqueante entre la sonda y el cebador, evitando que la apertura de la horquilla en ausencia de la secuencia diana produzca señal no específica(277). La reacción es instantánea, proporciona tiempos de reacción más cortos y una mejor discriminación. Además, esta técnica se caracteriza por ser altamente selectiva, con un límite de detección del 1% de ADN mutado, aunque sólo es capaz de identificar mutaciones conocidas.

#### 2.4.2.2.4. Técnicas de amplificación alelo específica

Uno de los procedimientos más utilizados es la *Allele-Specific Amplification* (PCR-ASA) o PCR Alelo-Específica, ya que es una de las metodologías más sencillas y económicas

## INTRODUCCIÓN

para la detección de mutaciones puntuales. Consiste en el empleo de 3 cebadores, uno directo (común para ambos tipos de variantes) y dos reversos. Uno de los reversos es complementario al alelo nativo y el otro es complementario al alelo mutante. Las muestras se preparan en dos mezclas de reactivos, una con el cebador para el alelo mutante y otra con el cebador del nativo. Tras la reacción, mediante una electroforesis en gel de agarosa se puede detectar la presencia/ausencia de alelos mutantes y nativos en la muestra. Su selectividad para el alelo mutante se encuentra entre valores de  $10^{-1}$  y  $10^{-3}$ (278). Es considerada una técnica con una sensibilidad significativamente mayor que la secuenciación (puede detectar hasta  $<1\%$  del ADN mutante), y está indicada para el análisis de mutaciones conocidas en muestras embebidas en parafina y fijadas en formalina que contienen pocas células tumorales(279). No obstante, su principal límite es la presencia de falsos positivos, además de ser muy sensible a pequeños cambios en las condiciones del proceso, lo que disminuye su reproducibilidad(280).

### 2.4.2.2.5. Técnicas de enriquecimiento basadas en PCR

Son estrategias que mejoran la selectividad del análisis porque existe un enriquecimiento o amplificación dirigida al aumento de la concentración de ADN mutado frente al nativo.

- **PCR Clamp**

Mediante un procedimiento de PCR Clamp (PCR bloqueante), se produce la hibridación de oligonucleótidos bloqueantes con la secuencia nativa, de forma que los cebadores se unen preferentemente a las cadenas mutantes, promoviendo su amplificación. La selectividad de esta tecnología se encuentra en el rango del 0,1-1 %(278), aunque requiere de procesos de diseño experimental y optimización del procedimiento a las técnicas existentes. Esta técnica de enriquecimiento puede emplear ácidos nucleicos peptídicos o LNA (*Locked Nucleic Acid*), oligonucleótidos con una afinidad elevada por las secuencias de ADN nativo, razón por la cual reciben el nombre de oligonucleótidos bloqueantes.

- **COLD-PCR**

La co-amplificación a baja temperatura de desnaturalización-PCR, se posiciona un paso por delante de la PCR convencional y es empleada previamente a la secuenciación o a ensayos de genotipado para mejorar la sensibilidad en la detección de los alelos mutados

hasta 100 veces más(281). Básicamente, la COLD-PCR consiste en una PCR en la que, tras el paso de desnaturalización de las cadenas, la temperatura se reduce a un valor tal que se produce una hibridación cruzada de las cadenas de ADN nativas con las de ADN mutado, originándose una incompatibilidad entre ambas cadenas debido a las variaciones nucleotídicas. La temperatura vuelve a elevarse hasta un valor inferior al de *melting* o fusión ( $T_m$ ) de las cadenas completamente emparejadas, de tal modo que las dobles cadenas de ADN mutado y nativo se desnaturalizarán, frente a las completamente emparejadas, que tardarán más en desnaturalizarse. Finalmente, la temperatura se reduce hasta la de alineamiento de los cebadores, que amplificarán las secuencias preferencialmente desnaturalizadas, es decir, las mutantes. Requiere un control preciso de la temperatura de desnaturalización durante la reacción (dentro de  $\pm 0.3^\circ\text{C}$ ), está restringida al análisis de secuencias cortas ( $\sim 200$  bp) y es susceptible a los errores de la polimerasa. No obstante, su selectividad presenta valores de  $10^{-1}$ - $10^{-4}$ (281), y sus principales ventajas son la simplicidad en la realización, amplificación de variantes tanto conocidas como desconocidas y aplicabilidad posterior a la secuenciación(278).

#### 2.4.2.2.6. Técnicas alternativas

- **SNaPshot**

La tecnología SNaPshot permite la identificación rápida y simultánea de las mutaciones más importantes. Su química se basa en la extensión de una única base con nucleótidos didesoxi de un cebador sin marcaje. Estos están marcados con un color de fluorescencia determinado, de tal modo que, tras el registro de la señal, se conoce qué base ha sido incorporada. Esta tecnología puede analizar hasta diez sustituciones nucleotídicas en una sola reacción, caracterizando específicamente la mutación. Sin embargo, las mutaciones menos frecuentes o raras no son investigadas. La sensibilidad de la técnica es del 5 %, aunque, con la combinación de otras técnicas se consigue aumentarla, como la combinación HRM-SNaPshot la cual presenta una sensibilidad analítica del 1,25 %(282).

## INTRODUCCIÓN

- **Droplet digital PCR o Tecnología ddPCR**

Droplet digital PCR (ddPCR) consiste en una PCR digital que emplea un sistema de gotas específico a partir de una emulsión agua-aceite, de forma que se produce una partición masiva de la muestra en 20.000 gotas (en < 2 min, 8 muestras se convierten en 8 sets de 20.000 gotas). Estas gotas funcionan igual que los tubos individuales en una PCR convencional, pero con la ventaja de que el formato es mucho más pequeño (escala nanolitro) y la amplificación ocurre masivamente, permitiendo la medición de miles de eventos de amplificación independientes a partir de una sola muestra.

La cantidad de muestra requerida es mucho menor en comparación con otros sistemas de PCR digital. Tras la PCR, cada gota se detecta por citometría de flujo y se clasifica en positiva o negativa para la amplificación. A su vez, por fluorescencia se cuantifica el ADN generado. Existen sistemas automatizados que permiten que la tecnología sea accesible al laboratorio de trabajo. La sensibilidad de esta tecnología es muy elevada, detectando la fracción de ADN mutante en un exceso de ADN nativo de 100.000 veces más, ya que, de media, el enriquecimiento de las moléculas mutantes por reacción es proporcional al número de particiones de la muestra. Por ejemplo, en ensayos para la detección de la mutación V600E en *BRAF*, se ha demostrado que esta tecnología permite detectar una fracción de ADN mutante del 0,001%, 1.000 veces menos que la PCR a tiempo real(283). Una de las principales desventajas es que requiere un equipamiento especializado y reactivos específicos.

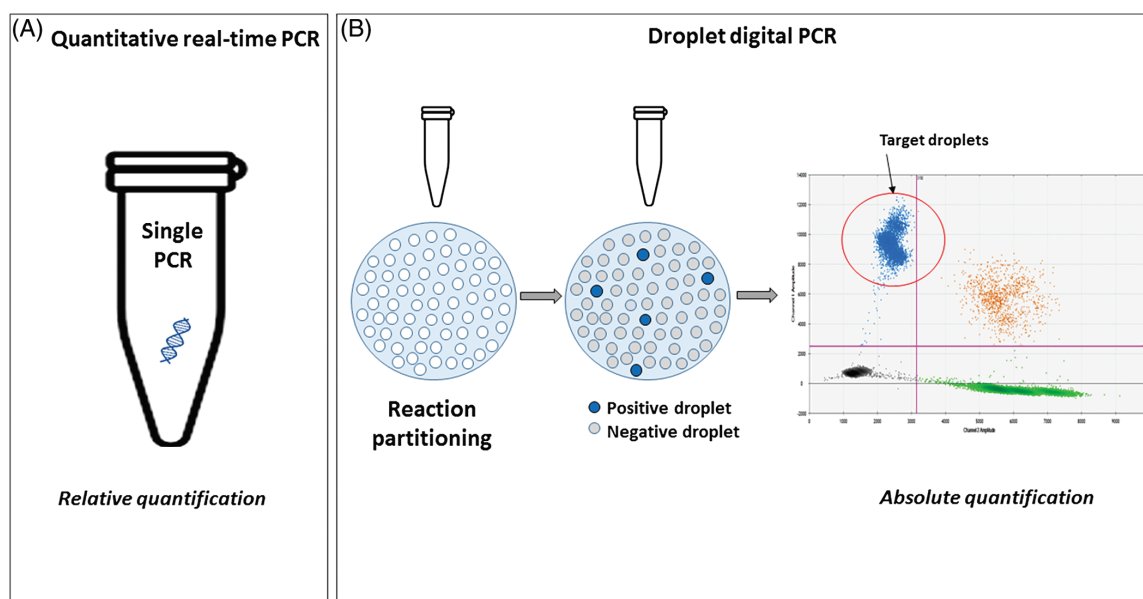


Figura 16. Representación esquemática de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en (A) tiempo real y (B) PCR digital(284).

- **Micromatrices de ADN**

Las micromatrices constituyen una herramienta precisa y de bajo coste para el genotipado en paralelo de múltiples marcadores, adecuada para el diagnóstico rutinario en los laboratorios clínicos. Los biosensores de ADN, micromatrices de ADN (microarrays) o también llamados comúnmente chips de ADN, se basan en la unión por complementariedad de sondas de ácidos nucleicos de simple cadena. Estos sistemas requieren de la inmovilización de estas sondas en la superficie para reconocer a su secuencia diana complementaria por hibridación. Se han desarrollado numerosos sistemas basados en esta hibridación en disolución o en soporte sólido, permitiendo la visualización rápida de los resultados mediante marcajes variados como la detección quimio-luminiscente, colorimétrica(285). Ofrecen una elevada sensibilidad. Para las mutaciones *KRAS* y *BRAF* se ha conseguido una sensibilidad del 0,01 %(286). Además, existen procedimientos de enriquecimiento de las muestras en ADN mutado y posterior hibridación de las mismas en chips comerciales e implementados en rutina clínica, como es el caso del sistema **INFINITI® KRAS-BRAF Assay** (Autogenomics, Inc.) que permite el análisis de un amplio rango de mutaciones(287).

## INTRODUCCIÓN

### 2.4.2.3. Comparación de los métodos de análisis genético

Muchas de las técnicas de análisis genético son simples de manejar y aplicables de forma rutinaria. No obstante, su selectividad puede no ser suficiente para determinadas mutaciones. Así, surgen las técnicas con mayor selectividad, aunque su aplicación en diagnóstico clínico rutinario se ve afectada por la dificultad en el manejo, el consumo de tiempo o el coste. Todas ellas tienen como base principal la detección de las mutaciones presentes en las muestras tumorales embebidas en parafina. Estos análisis deben ser rápidos, para la clasificación de los pacientes en el menor tiempo posible, y de bajo coste para su implantación en la mayor parte de laboratorios clínicos. La secuenciación destaca por la elevada fiabilidad de los resultados, aunque los tiempos de análisis son largos y se requiere mucha cantidad de muestra mutante. Estas dificultades pueden ser superadas por las tecnologías SSCP, DGGE, dHPLC o HRM, ya que requieren menor cantidad de alelos mutantes y garantizan una evaluación primaria del producto amplificado sin riesgo de contaminación. Sin embargo, no sirven para identificar mutaciones específicas y es necesaria la aplicación consecutiva de un método directo de confirmación de los resultados analíticos(279). La capacidad de evaluar diferentes muestras en paralelo se consigue con técnicas implementadas clínicamente como la PCR-ASA, ARMS o micromatrices. Todas destacan por su elevada selectividad y multiplexado, aunque en el caso de las variantes de PCR, requieren el uso termocicladores y reactivos especiales de gran coste. En este sentido, el análisis con micromatrices permite la identificación rápida y concreta de la base mutada con un equipamiento de bajo coste.

Los métodos empleados para el análisis mutacional del gen KRAS (Tabla 11) se basan en diferentes principios, pero todos ellos tienen como objetivo la detección de las mutaciones presentes en las células tumorales que se encuentran en las muestras embebidas en parafina. Estos análisis deben ser rápidos, con el objetivo de clasificar al paciente en el menor tiempo posible, y baratos para su implantación en la mayor parte de laboratorios clínicos.

Una de las tecnologías más desarrolladas para este análisis es la de secuenciación. Sin embargo, presenta elevados tiempos para el análisis, así como requiere la presencia de una gran cantidad de alelos mutantes presentes para su detección. Estas dificultades se pueden superar con las tecnologías de HRM, SSCP y DGGE, las cuales pueden obtener los resultados en menos de 24 horas y requieren de una menor cantidad de alelos mutantes presentes en las muestras. No obstante, estas tecnologías no ofrecen la posibilidad de



analizar varias muestras en paralelo y requieren de la confirmación de sus resultados mediante secuenciación. La capacidad de testar diferentes muestras en paralelo se puede alcanzar con las técnicas de digital PCR y micromatrices. El análisis basado en digital PCR, aunque ofrece un gran multiplexado, requiere de termocicladores especiales de gran coste, mientras que los análisis basados en micromatrices, no sólo ofrecen una gran capacidad de multiplexado, sino que permiten la identificación de la base mutada.

**Tabla 11. Comparación de métodos de análisis genético**

Técnicas de genotipado	Sensibilidad (% mutación)	CARACTERÍSTICAS
<b>Método Sanger</b>	15-50	Requiere mayor cantidad de ADN mutado para su detección.
<b>Pirosecuenciación</b>	1,25-6	Requiere equipamiento especial (pirosecuenciador). Problema de lectura de homopolímeros de más de 5 nucleótidos.
<b>HRM</b>	1(3)-10	Precisa equipamiento específico. Requiere experiencia en biología molecular
<b>SSCP/DGGE</b>	1	Requiere equipamiento especial. Precisa experiencia en HPLC.
<b>SNAPshot</b>	5	Alta precisión en los resultados. Flexible a otras mutaciones
<b>Digital PCR</b>	0,1-10 <sup>-3</sup>	Requiere uso de termocicladores especiales.
<b>Micromatrices</b>	<0,01	Bajo coste. Sensibilidad adecuada para diagnóstico médico. Resultados rápidos No detecta mutaciones que no son conocidas.

## INTRODUCCIÓN

### 2.4.3. Clasificación por Subtipos Moleculares

Datos recientes sobre las caracterizaciones moleculares integrales en el CCR, incluidas las clasificaciones *The Cancer Genoma Atlas* (TCGA) y el *Consensus Molecular Subtype* (CMS), han aumentado nuestra comprensión de los puntos genómicos y epigenómicos en el CCR y han permitido su clasificación en varios subtipos de acuerdo con sus distintas variaciones moleculares y características clínicas.

#### 2.4.3.1. Caracterización Molecular Integrada

En 2012, la red de investigación TCGA realizó una caracterización molecular exhaustiva en 224 casos de CCR y analizó secuencias de exoma, número de copias de ADN, metilación del promotor y patrones de expresión de ARNm y microARN. Un subconjunto de estas muestras, representado por 97 casos, fue examinado por SNG. Los tumores con tasas de mutación  $> 12$  mutaciones por  $10^6$  bases (media de mutaciones totales: 728), que representaron el 16% del número total de casos examinados, se designaron como CCR hipermutados, mientras que los tumores con tasas de mutación de  $< 8,24$  mutaciones por  $10^6$  las bases (media de mutaciones totales: 58) se denominaron CCR no hipermutados (84%). Entre los CCR hipermutados, el 75% se enriquecieron por MSI, metilación de MLH1 y CIMP, mientras que el 25% restante presentaron mutaciones somáticas en genes MMR y de polimerasa E (POLE), mostrando tasas de mutación de  $> 40$  mutaciones por  $10^6$  bases. Los CCR no hipermutados se enriquecieron por mutaciones somáticas en los genes *APC* (81%), *TP53* (60%), *KRAS* (43%), *PIK3CA* (18%), *FBXW7* (11 %), *SMAD4* (10%), *TCF7L2* (9%), *NRAS* (9%), *FAM123B* (7%), *CTNNB1* ( $\beta$ -catenina) (5%), *ACVR1B* (4%) y *SOX9* (4%). *FAM123B* (también conocido como WTX) es un regulador negativo X-ligado de la vía señalización de Wnt- $\beta$ -catenina, y la mayoría de sus mutaciones implica la pérdida de su función. En los CCR hipermutados, los genes de *ACVR2A* (63%), *APC* (51%), *TGFBR2* (51%), *BRAF* (46%), *MSH3* (40%) y *MSH6* (40%) fueron objetivos frecuentes de la mutación. Dos genes que con frecuencia se mutaron en CCR no hipermutados se mutaron con menos frecuencia en los CCR hipermutados: *TP53* (60% frente a 20%) y *APC* (81% frente a 51%). Todos los casos de CCR no hipermutados se caracterizaron por ser MSS y se asociaron con mayor frecuencia a alteraciones del número de copias somáticas (SCNA), lo que indica que este grupo está caracterizado por

cambios cromosómicos y subcromosómicos. La vía de señalización Wnt- $\beta$ -catenina se activó en el 93% de los CCR no hipermutados y en el 97% de los CCR hipermutados, una activación que involucró tanto la inactivación de *APC* o activación de *CTNNB1* y cambios en muchos otros genes implicados en la regulación de esta vía, incluidos *FBXW7*, *FAM123B*, *SOX9* y *TCF7L2*. La vía de señalización del TGF- $\beta$  se desreguló en el 27% de los CCR no hipermutados y en el 87% de los CCR hipermutados.

### 2.4.3.2. Perfiles de Expresión genética

Aunque se llevaron a cabo varios estudios de perfiles de expresión génica para clasificar los casos de CCR en subtipos, no se determinó una única clasificación(288, 289). Por lo cual, los miembros del CMS decidieron combinar su base de datos genómicos que comprendían 4151 muestras, incluida la fuente TCGA, para generar subtipos moleculares consensuados mediante la aplicación de técnicas de agrupamiento no supervisadas(290). A partir de esto, se establecieron cuatro CMS (Figura 17).

- **CMS1 (MSI inmune, 14%)** se caracteriza por mostrar MSI y activación inmune; CIMP positivo, SCNA bajo, *BRAF* mutado; y ocurre en mujeres mayores y en colon proximal.
- **CMS2 (canónico, 37%)** se caracteriza por presentar MSS, CIN y activación de la vía Wnt/MYC; CIMP-negativo y SCNA-alto; muestra la presencia de mutaciones de *APC* y *TP53*; ocurre en colon distal hasta recto; y muestra una supervivencia superior después de una recaída.
- **CMS3 (metabólico, 13%)** se caracteriza por presentar MSS, CIMP bajo y SCNA-intermedio, muestra la presencia de mutaciones *KRAS* y *APC*, y exhibe una forma epitelial y una reprogramación metabólica.
- **CMS4 (mesenquimatoso, 23%)** se caracteriza por presentar MSS, CIMP-negativo y SCNA-alto, se produce en etapas avanzadas y muestra una SG más pobre y activación de TGFB, infiltración estromal, activación de transición epitelio-mesenquimal, remodelación de matriz y angiogénesis.

Las muestras con características mixtas (13%) posiblemente representan un fenotipo de transición o una heterogeneidad intratumoral. Aunque este sistema de clasificación CMS

## INTRODUCCIÓN

no era un estratificador terapéutico, esta subdivisión mediante análisis de datos facilitó una mejor comprensión de los amplios grupos biológicos que comprenden el CCR.

### 2.4.3.3. Subtipos clasificados por características moleculares

Aunque el CCR es una enfermedad biológicamente heterogénea, la categorización en distintos subtipos utilizando una combinación de características moleculares podría proporcionar información sobre los diferentes resultados clínicos.

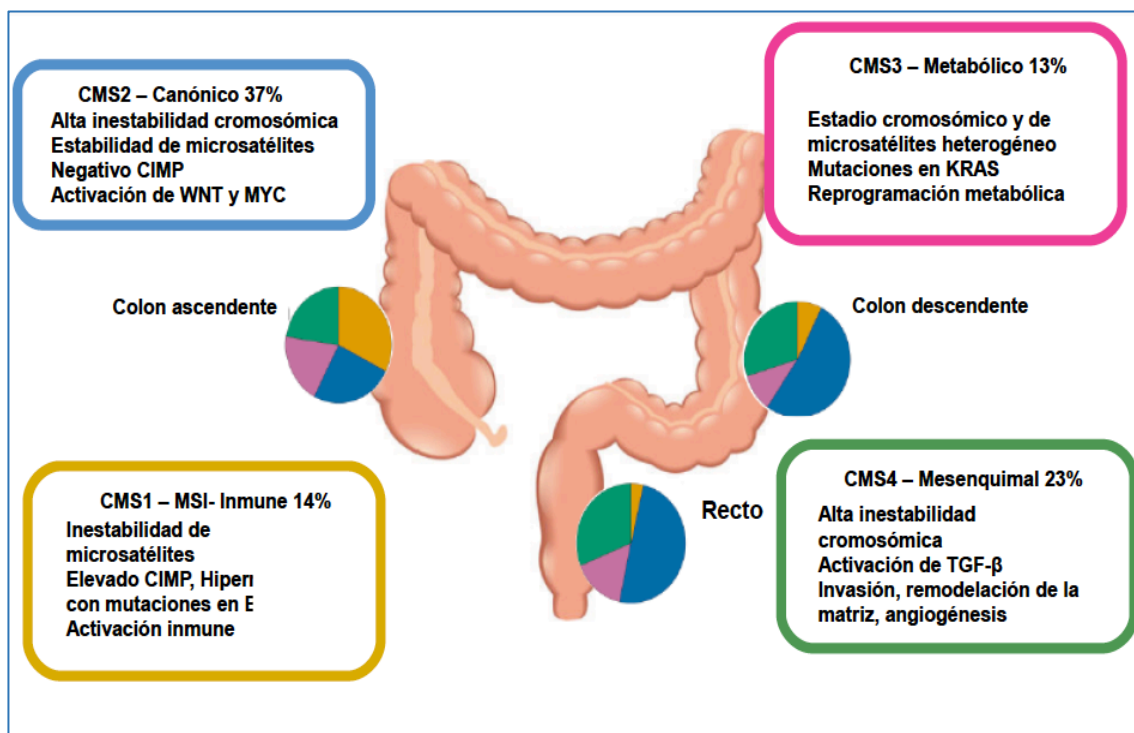


Figura 17. La taxonomía del cáncer colorrectal de acuerdo con el Consorcio de Subtipo de cáncer colorrectal(290).

Utilizando una cohorte de pacientes con cáncer de colon en estadio III en un ensayo de quimioterapia adyuvante, se demostró que la combinación de mutaciones *KRAS* y *BRAF*<sup>V600E</sup> con un estado de MMR del ADN categoriza los cánceres de colon en cinco subtipos con características clinicopatológicas distintas, incluyendo resultados clínicos(291). Los tumores MMR-competentes con mutaciones *BRAF* o *KRAS*, que comprenden el 42% de todos los casos, exhibieron tasas de mortalidad más altas que los tumores sin este fenotipo. Tumores *BRAF* wild-type, *KRAS* wild-type y MMR-competentes, que comprende el 49%, fueron el subtipo más frecuente en la cohorte y se

asociaron con una mejor supervivencia que los tumores que carecían de este fenotipo(157). Usando una cohorte poblacional de pacientes con CCR en etapa I-IV, se demostró que la combinación de los estados de MSI y CIMP y las mutaciones de *BRAF* y *KRAS* permitieron clasificar los casos en cinco subtipos con distintas características clínico-patológicas (Figura 18)(292).

De los cinco subtipos, los CCR tipo 5, que comprenden el 7% de todos los casos y que muestran MSI y fenotipos *BRAF wild-type*, *KRAS wild-type* y CIMP negativo, mostraron las tasas de mortalidad más bajas y se caracterizaron clinicopatológicamente por su aparición en el colon proximal y mostrándose en edades tempranas. Los CCR de tipo 4 (47%), definidos por mostrar MSS y fenotipos *BRAF wild-type*, *KRAS wild-type* y CIMP negativo, representan el subtipo más prevalente y se caracterizaron clinicopatológicamente por su vía canónica con mutaciones *APC*, su prevalencia en varones y por su distribución en colon distal hasta el recto. El tipo 4 corresponde principalmente a CMS2 (subtipo canónico) en la clasificación CMS(290).

Los CCR tipo 2, que comprenden el 4% de los casos examinados, se definen como MSS y fenotipos *BRAF* mutado, *KRAS wild-type* y CIMP positivo, muestran las tasas de mortalidad más altas y se caracterizaron clínico-patológicamente por su prevalencia en mujeres, en colon proximal, mostrando un inicio de edad tardío. Estos dos estudios sugieren que la categorización basada en las características moleculares de los CCR es útil para comprender sus características biológicas y para predecir los resultados clínicos. Un estudio reciente informó que la positividad de CIMP podría utilizarse para estratificar a pacientes con pronóstico precario con MSS y *BRAF* mutado, que corresponden los CCR de tipo 2(293).

INTRODUCCIÓN

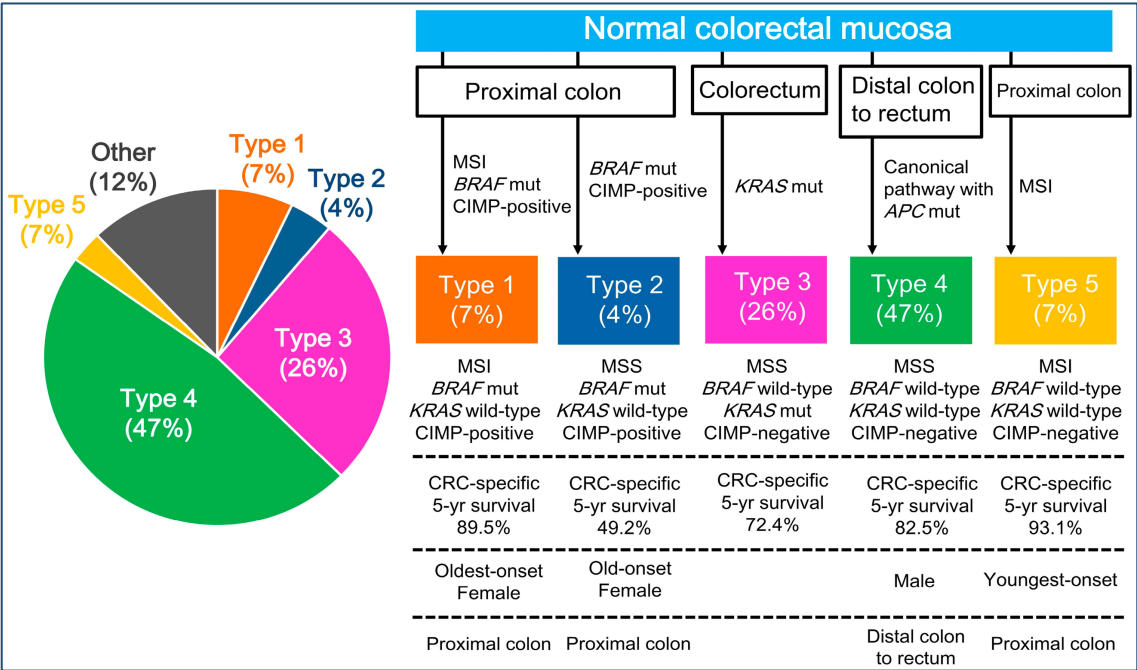


Figura 18. Categorización en cinco subtipos según el estado de MSI y CIMP y la presencia de mutaciones de *BRAF* y *KRAS*(292).

2.5. Tratamiento

El tratamiento del CCR ha presentado un desarrollo importante en las últimas décadas, debido a la evolución en la técnica quirúrgica y terapia oncológica. Sin embargo, las características moleculares específicas del tejido tumoral conllevan a una variación en los resultados oncológicos en cada paciente. Actualmente, la elección del tratamiento óptimo en cada paciente se orienta según las características anatómo-patológicas y moleculares del tumor.

2.5.1. Tratamiento Quirúrgico

La cirugía es el pilar fundamental del tratamiento de la enfermedad localizada y la única modalidad terapéutica potencialmente curativa. El objetivo debe ser la resección amplia del tumor primario con márgenes proximal y distal de al menos 5 cm junto al pedículo vascular y los ganglios linfáticos de drenaje del segmento de colon afecto. Además de su valor terapéutico, la linfadenectomía proporciona información pronóstica importante que puede ser útil para establecer la indicación de QT adyuvante. La mayoría de las guías de

consenso internacionales recomiendan el examen histológico de al menos 12 ganglios linfáticos para considerar que el estadiaje es adecuado y el empleo de técnicas adicionales para intentar incrementar la tasa de detección si no se alcanza este número. La experiencia del equipo quirúrgico es de vital importancia en el éxito de la cirugía, considerándose un factor pronóstico independiente. La presencia de una obstrucción y/o perforación intestinal son complicaciones frecuentes de las neoplasias de colon cuyo tratamiento quirúrgico depende de la localización del tumor y del estado general del paciente. En los tumores obstructivos del colon ascendente y transversal, generalmente es posible realizar con seguridad una colectomía derecha o colectomía derecha ampliada con anastomosis ileocólica primaria. Sin embargo, en los tumores de colon descendente, la mayoría de los cirujanos prefieren realizar una colostomía tras la resección colónica, aunque varios estudios sugieren que la cirugía con anastomosis primaria no se asocia a un incremento significativo de la morbilidad. En cuanto al manejo de los tumores perforados, en los pacientes estables y con peritonitis no generalizadas, la resección del tumor con anastomosis primaria es una opción segura. Sin embargo, en los casos de peritonitis difusa, perforación libre y/o pacientes hemodinámicamente inestables, los procedimientos de elección son la colocación de un drenaje percutáneo o la realización de una colostomía proximal temporal o definitiva. En cuanto a la colectomía asistida por laparoscopia, múltiples ensayos clínicos prospectivos randomizados y metaanálisis han demostrado que los resultados oncológicos y la morbilidad intra y postoperatoria son comparables a los que se obtienen con la cirugía abierta en pacientes adecuadamente seleccionados y en manos de cirujanos con experiencia en dicha técnica. Se consideran candidatos apropiados los pacientes con tumores localizados preferentemente en el colon izquierdo, sin signos de obstrucción ni perforación intestinal, sin invasión de estructuras adyacentes y sin antecedentes de una cirugía abdominal extensa que condicione la existencia de adherencias importantes. Las limitaciones del abordaje laparoscópico incluyen un tiempo quirúrgico generalmente superior, la necesidad de una adecuada formación y destreza en el procedimiento y el coste de los equipos. Sin embargo, ofrece las ventajas potenciales de un abordaje mínimamente invasivo que conlleva menor tiempo de estancia hospitalaria, menores requerimientos analgésicos, y mejores resultados estéticos. La conversión a cirugía abierta es necesaria en aproximadamente un 11-20% de los pacientes y en la mayoría de las ocasiones se relaciona con las características del tumor y la experiencia del cirujano.

## INTRODUCCIÓN

**Cáncer de recto.** La escisión mesorrectal total (EMT) es el criterio quirúrgico estándar en la cirugía del cáncer de recto. El concepto de la EMT es la disección quirúrgica y anatómica a través de la fascia mesorrectal o "holly plane", esta técnica permite una tasa de recidiva local baja y por lo tanto una mayor tasa de supervivencia libre de enfermedad (SLE)(294). Además, se recomienda la ligadura alta (resección D3) de la arteria mesentérica inferior, ya que asegura una extirpación aceptable de ganglios linfáticos en la pieza quirúrgica(295). Moynihan y col. argumentaron sobre la importancia de la diseminación venosa en el tratamiento quirúrgico del cáncer de recto generando una tendencia en la ligadura de la vena hemorroidal superior(296), aunque actualmente no tiene un consenso aceptado.

**Cáncer de colon.** Recientemente, se establece que la cirugía de colon debe contener los principios quirúrgicos similares a la cirugía del cáncer de recto proponiéndose la escisión mesocólica completa (EMC) con una disección D3 de los ganglios linfáticos(297). Sin embargo, existen estudios limitados relacionados con la supervivencia después de la CME. En un artículo reciente(298), mostraron que la tasa de supervivencia relacionada con el cáncer a 5 años aumentó de 61% a 80% con la implementación de la EMC. De igual manera, los artículos recientemente publicados han demostrado resultados prometedores relacionados con las nuevas e innovadoras técnicas de resección D3 en la hemicolectomía derecha(299). Sin embargo, es necesario una planificación quirúrgica preoperatoria individualizada y personalizada, debido a la múltiple variación anatómica de la linfadenectomía D3.

### 2.5.2. Quimioterapia más Radioterapia Neoadyuvante

Se han realizado numerosos ensayos para evaluar el impacto de la radioterapia (RT) y la quimioterapia (QT) pre y postoperatorias en el tratamiento del cáncer de recto. En una revisión realizada por la *Cochrane* en 2012, se evaluó 6 ensayos clínicos controlados sobre la quimio/radioterapia (QRT) preoperatoria en carcinomas de recto localmente avanzados. Se concluyó que no había diferencias significativas en la SG entre la QRT y la RT en monoterapia. Sin embargo, la QRT se asoció con una menor recurrencia local en pelvis. Se demostró además, que la QRT preoperatoria lograba una reducción significativa del tamaño tumoral, lo que beneficiaba al cirujano en la intervención quirúrgica(300). En una revisión de Petersen y col. de 21 ensayos aleatorios controlados en la que se evaluaron la QT preoperatoria en pacientes que habían sido sometidos a una



resección R0 por cáncer de recto, concluyeron que la QT preoperatoria mejora las tasas de SG y SLE(301), reduce las recidivas locales, se asocia a menos toxicidad que la QRT postoperatoria, y permite realizar una cirugía conservadora de esfínter en una mayor proporción de casos. La QRT neoadyuvante es un tratamiento estandarizado para pacientes seleccionados con cáncer de recto, alrededor del 15 al 27% de los pacientes tienen una respuesta patológica completa (RpC) (302). Se ha demostrado que los pacientes con una RpC después de la QRT tienen mejores resultados a largo plazo indicando un perfil biológico tumoral favorable. Estos pacientes, pueden presentar una respuesta clínica favorable sin necesidad de cirugía posterior. Sin embargo, todavía no se cuenta con los medios necesarios para identificar a los pacientes que responderán a la QRT neoadyuvante, dejando solos a los respondedores completos. Maas y col. argumenta que los tumores deben ser genéticamente analizados para identificar a los pacientes respondedores, aunque actualmente no se conoce las alteraciones genéticas que deben ser identificadas(302). Se ha establecido que aún existen varios desafíos en el perfil genético de los tumores con CCR(303), incluida la heterogeneidad genética intratumoral. El descubrimiento de una sola expresión genética con utilidad clínica es poco probable por lo que es necesario la búsqueda de un conjunto de vías genéticas alteradas que puedan predecir una RpC. Diferentes esquemas de terapia neoadyuvante son utilizados en la actualidad: **a)** uracilo/tegafur (UFT)-leucovorin más RT, se obtienen tasas de regresión en un 63% y una respuesta patológica completa en el 25% de los casos con una SG a 3 años es del 90% y una SLE del 92%; **b)** Capacitabina y Oxiplatino más RT, se obtiene una RpC en el 20.9-23%. Sin embargo, se ha descrito un 10.9% de metástasis a distancia y un 2.2% de recurrencia local. Las tasas de regresión llegan cerca del 65% y **c)** Irinotecan y Capacitabina más RT, se obtiene un 27% de RpC y 53.2% de SLE a los 3 años. Como tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto localmente avanzado, la RT a dosis de 45 a 60 Gy administradas en 25 fracciones durante 5 semanas (1.8-2 Gy/fracción) más quimioterapia concomitante con 5-FU, ha sido la terapia de primera línea utilizada en los últimos años, seguida de cirugía a las 4 - 8 semanas posteriores a la finalización de la neoadyuvancia.

## INTRODUCCIÓN

### 2.5.3. Quimioterapia adyuvante en cáncer de colon localizado

En pacientes con CCR sometidos a una cirugía potencialmente curativa, se considera que las recidivas de la enfermedad se originan a partir de micrometástasis clínicamente ocultas presentes en el momento del diagnóstico. El objetivo del tratamiento adyuvante es, por tanto, la erradicación de dichas micrometástasis, reduciendo así el riesgo de recidiva y aumentando la probabilidad de curación. Aunque las tasas de recurrencia son significativamente diferentes en los estadios II y III, la mayoría de los estudios randomizados de QT adyuvante incluyen ambos grupos de pacientes, realizando con frecuencia análisis exploratorios planeados con la intención de determinar la eficacia del tratamiento en cada estadio. En los estadios I no existe indicación de tratamiento adyuvante, puesto que la supervivencia a los 5 años con tratamiento quirúrgico exclusivamente es del 93-95%. Diversos ensayos clínicos en la década de los 90 demostraron que la QT adyuvante basada en fluoropirimidinas asociada a levamisol o modulada con ácido folínico suponía un beneficio en la supervivencia de los pacientes con CC estadio III<sup>7-9</sup>. Estos resultados han sido mejorados posteriormente al asociar oxaliplatino a los esquemas con fluoropirimidinas. Más recientemente, se ha evaluado el valor de varios agentes biológicos como el bevacizumab o el cetuximab en combinación con la QT adyuvante, en base al beneficio demostrado en la enfermedad avanzada, pero no se ha conseguido demostrar una mejoría en el pronóstico global. Se considera que el tratamiento adyuvante consigue una reducción absoluta del riesgo de fallecimiento del 3-5% en los estadios II cuando se utilizan fluoropirimidinas en monoterapia y del 15-20% en los estadios III tratados con combinaciones de fluoropirimidinas y oxaliplatino.

### 2.5.4. Tratamiento del carcinoma metastásico

El CCRm supone hasta el 50% de los casos de nuevos diagnóstico<sup>2</sup>. A pesar de los avances terapéuticos, el pronóstico en estos casos sigue siendo muy pobre, con una supervivencia media de 18 a 21 meses<sup>(304)</sup>. La QT para el CCR se ha basado tradicionalmente en la administración de 5-FU, con la introducción más reciente de otros agentes citotóxicos, como el irinotecan, el oxaliplatino y la capecitabina. En los últimos 5 años, la mayor comprensión de los procesos involucrados en la transformación de células normales a células cancerígenas ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra dianas específicas y claves en la carcinogénesis. Esta terapia involucra a

los fármacos que actúan de forma selectiva sobre vías moleculares específicas involucradas en la tumorigénesis o en la progresión tumoral(305). Actualmente, existen tres agentes de tratamiento aprobados en el CCRm: bevacizumab, cetuximab y panitumumab. el primero se une al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) inhibiendo su acción, mientras que los últimos bloquean el EGFR.

### 2.5.4.1. Anticuerpos monoclonales anti-EGFR

Cetuximab y panitumumab son anticuerpos monoclonales que bloquean el sitio de unión del EGFR (al unirse a su dominio extracelular), inhibiendo la señalización intracelular(306)(Fig. 19).

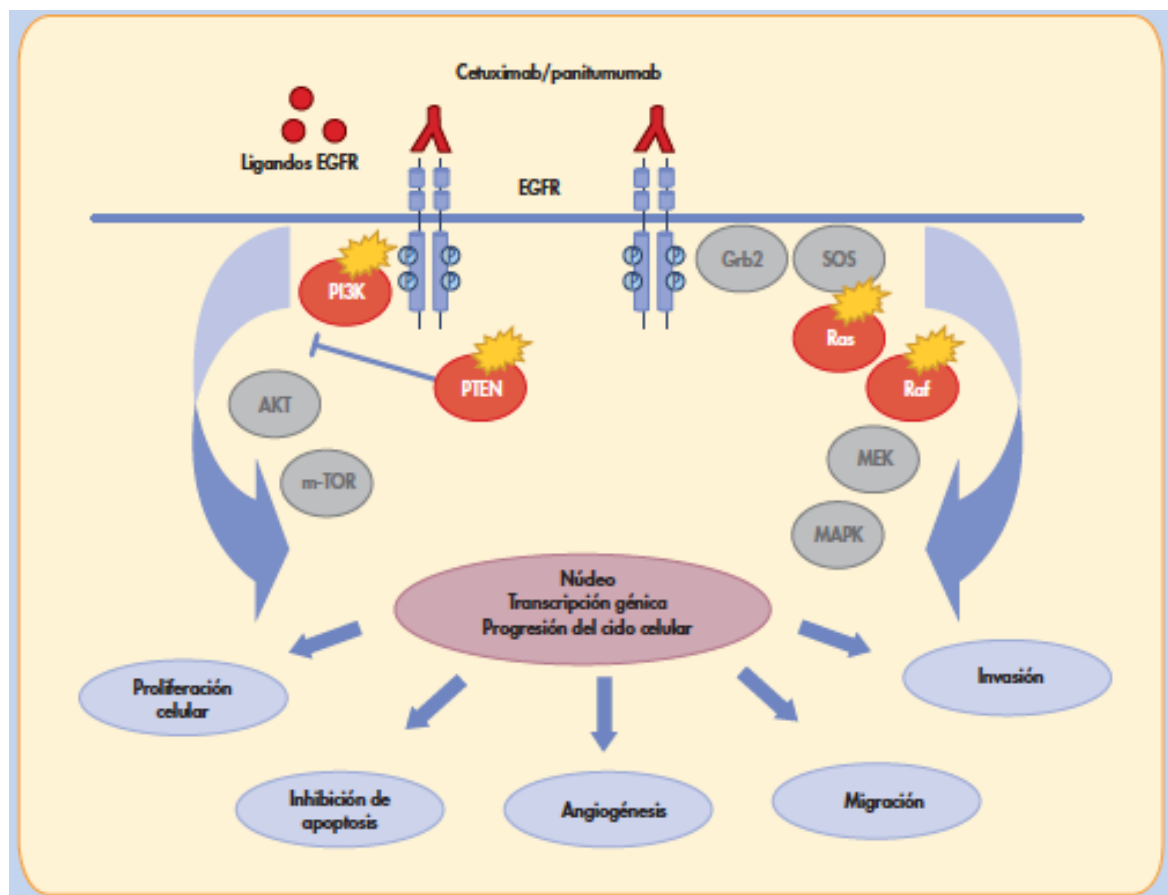


Figura 19. Representación esquemática de los anticuerpos monoclonales cetuximab y panitumumab, y la vía de señalización intracelular dependiente del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)(307).

## INTRODUCCIÓN

- **Cetuximab (Erbix®)**

Es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano de tipo IgG1, que puede inducir citotoxicidad mediada por el propio anticuerpo. El exantema acneiforme es el efecto adverso más frecuente (70%) y se correlaciona con la eficacia al tratamiento. Otros efectos adversos más raros (1-10%) incluyen las reacciones alérgicas, fatiga, náuseas, fiebre, diarrea y mucositis.

- **Panitumumab (Vectibix®)**

Es el segundo anticuerpo anti-EGFR aprobado para su uso en el CCRm y en contraste con el cetuximab, es un anticuerpo IgG2 puramente humano, sin citotoxicidad dependiente del anticuerpo.

La decisión terapéutica en el CCR se ha basado tradicionalmente en el estadio tumoral, la cinética de progresión tumoral y los síntomas del paciente. Los anticuerpos monoclonales anti-EGFR suponen el primer paso para una medicina personalizada basada en las características genéticas del tumor ya que inciden específicamente en la biología molecular del cáncer. Sin embargo, tan sólo un 10-20% de los pacientes con CCRm tratados con estos fármacos presentan un beneficio clínico(308). Este hecho, sumado al elevado precio de estos tratamientos, así como sus efectos secundarios han promovido la realización de múltiples estudios dirigidos a identificar los mecanismos moleculares de resistencia primaria a cetuximab o panitumumab. A continuación, se detallan los eventos moleculares más significativos asociados a la respuesta al tratamiento con estos fármacos. Numerosos estudios han mostrado que las mutaciones activadoras en *KRAS* son el principal factor predictivo de eficacia en pacientes que reciben cetuximab y panitumumab. Las mutaciones somáticas en este gen permiten una activación intrínseca de la cascada de señalización dependiente de EGFR (fig. 18), de forma que esta activación es independiente de la expresión de EGFR y, por tanto, no puede inhibirse por anticuerpos anti-EGFR(309).

Recientemente, se han publicado tres grandes estudios aleatorizados fase III con cetuximab, incluidos los estudio OPUS (oxaliplatino y cetuximab como primera línea de tratamiento en el CCRm)(310), el estudio CRYSTAL (irinotecan y cetuximab como primera línea de tratamiento en CCRm) y el estudio de NCIC-CTG (monoterapia con anti-EGFR en pacientes con recidiva, pacientes refractarios o con contraindicaciones a la quimioterapia)(196). Los estudios OPUS y CRYSTAL demostraron de forma consistente

que el añadir cetuximab al tratamiento de primera línea en el CCRm basado en 5-FU, ácido folínico y oxaliplatino (FOLFOX) o irinotecan (FOLFIRI) no era beneficioso en pacientes con tumores con mutaciones somáticas en *KRAS*. Además, el estudio OPUS sugirió que cetuximab puede incluso ser perjudicial para estos pacientes. El estudio NCIC-CTG ha mostrado resultados similares. Por tanto, las autoridades de salud europeas han restringido el uso de panitumumab y cetuximab, ya sea en monoterapia o en combinación con quimioterapia, a pacientes con CCRm sin mutaciones en *KRAS*(269). Es importante destacar que las mutaciones *KRAS* representan tan sólo el 35-45% de los pacientes no respondedores a la terapia anti-EGFR, de modo que, aunque las mutaciones en este gen son un biomarcador muy específico de falta de respuesta (93%), su sensibilidad es baja (47%)(311). Estudios recientes se han centrado en el análisis de otras moléculas involucradas en la cascada de señalización de EGFR, como *BRAF* y *PIK3CA/PTEN*. Recientemente, se ha mostrado que las mutaciones de *BRAF* también afectan de forma negativa a la respuesta a estos fármacos. El primer trabajo retrospectivo se realizó en una cohorte de 132 pacientes, mostrando que ninguno de los pacientes respondedores presentaba mutación del gen *BRAF*, mientras que 11 (14%) de los 79 sujetos no respondedores eran portadores de la mutación en este gen. Dado que es bien sabido que las mutaciones *KRAS* y *BRAF* son mutuamente excluyentes, estos dos marcadores juntos pueden identificar hasta un 50-55% de los no respondedores. Otros grupos han confirmado estos datos; sin embargo, es necesario realizar estudios prospectivos para incluir de forma definitiva a *BRAF* como factor de resistencia a los anticuerpos anti-EGFR.

El EGFR también activa la vía de señalización *PI3K* (fig.18). Esta vía puede estar anormalmente activada por mutaciones en la unidad P110 de *PIK3CA* o por la inactivación de *PTEN*, un conocido gen supresor de tumores. El papel de la desregulación de esta vía de señalización en la respuesta a cetuximab y panitumumab ha mostrado resultados conflictivos(312). Sin embargo, parece ser que determinadas mutaciones activadoras en *PIK3CA* están asociadas a la resistencia al tratamiento, aunque la correlación dista mucho de la observada con *KRAS*. Por otro lado, la inactivación de *PTEN* también se ha asociado a falta de respuesta al tratamiento(313). Las mutaciones en *PI3K* y la inactivación de *PTEN* pueden coexistir con las mutaciones en *KRAS* y *BRAF*, hecho que puede explicar la dificultad en demostrar la contribución individual de estas alteraciones en la falta de respuesta. A la espera de estudios que evalúen específicamente

## INTRODUCCIÓN

la contribución de la alteración de esta vía en la respuesta a anti-EGFR, PI3K y PTEN, no se utilizan como marcadores en la práctica clínica.

### 2.6. Pronóstico

#### 2.6.1. Factores pronósticos

Existen varios factores pronósticos reconocidos en el CCR que pueden determinar el riesgo de recurrencia. La precocidad del diagnóstico y, por ende, el estadio tumoral junto con las características biológicas del tumor y la calidad de la pieza quirúrgica son factores determinantes. El conocimiento de estos factores es fundamental para la decisión de técnicas quirúrgicas y en el tratamiento sistémico en cada paciente. El pronóstico global ha mejorado en los últimos años debido a un mayor acceso a pruebas de detección temprana y a tratamientos oncológicos específicos capaces de reducir la aparición de recurrencia de enfermedad. En ausencia de tratamiento adyuvante, aproximadamente el 50-60% de todos los pacientes con enfermedad susceptible de resección se curará con el tratamiento quirúrgico exclusivo, mientras que el 40-50% restante recaerá. La QT adyuvante permite rescatar a aproximadamente un 15-20% de los pacientes que desarrollarían una recaída, incrementando la supervivencia a los 5 años hasta un 70-75%(26). La extensión del tumor en la pieza anatómica tras una cirugía potencialmente curativa, establecida mediante el análisis anatomopatológico sigue siendo la herramienta principal para establecer un pronóstico en cada paciente. Sin embargo, en muchos casos los resultados oncológicos no coinciden con los habituales para su etapa tumoral. Comprender los mecanismos detrás de estas discrepancias permitirá un enfoque más preciso y personalizado, unas opciones de tratamiento mejor establecidas y en última instancia, una mejora en el pronóstico. En los últimos años, nuevas pruebas han tenido un impacto positivo en la comprensión del pronóstico individual. Esto incluye las características específicas del paciente, la efectividad del equipo multidisciplinario, el conocimiento refinado de los factores morfológicos histopatológicos, nuevos marcadores moleculares e indicadores inmunológicos. Gran parte de la información inmunológica y molecular proporciona formas prometedoras para clasificar y comprender el pronóstico del CCR, aunque su importancia relativa sigue siendo incompleta.

### 2.6.1.1. Factores Clínicos

- **Sexo**

El sexo masculino es un factor de mal pronóstico en el CCR. Según los datos del *Norwegian Cancer Register*(314), las mujeres tienen un 12% menos de riesgo de mortalidad específica por cáncer. Se ha demostrado que el sexo masculino tiene una mayor incidencia de CCR y, en general, presentan un mayor riesgo de enfermedad recurrente después de la resección curativa(315). Aunque los datos no son concluyentes, algunos estudios con QT adyuvante basada en fluoropirimidinas sugieren que las mujeres, sobre todo menores de 50 años, presentan un mejor pronóstico que los varones de la misma edad. Se ha postulado que el mecanismo biológico que explicaría dicha diferencia es el efecto protector de los estrógenos en relación con el desarrollo de tumores MSI-H(316).

- **Edad**

La incidencia de CCR en pacientes jóvenes (20-40 años) se ha incrementado en los últimos 25 años. Varios estudios han demostrado que el CCR en esta población tiene un peor pronóstico, lo cual podría explicarse por la mayor incidencia de tumores con características histológicas desfavorables (pobrementemente diferenciados, histología mucinosa o células en anillo de sello) y el diagnóstico en estadios más avanzados, así como por la menor adherencia a los programas de prevención primaria(317). Sin embargo, otros estudios demuestran que, a igualdad de estadio, no se observan diferencias en la supervivencia específica por cáncer respecto a pacientes de mayor edad(318).

- **Antígeno carcinoembrionario**

Los niveles preoperatorios elevados de antígeno carcinoembrionario (CEA) se asocian con un mayor riesgo de recurrencia. Este marcador tumoral se incluye en la mayoría de los programas nacionales de seguimiento después de la cirugía R0 generalmente asociada a pruebas radiológicas(319). En un metaanálisis se concluyó que el CEA tiene una alta especificidad, pero una sensibilidad insuficiente para detectar la recurrencia de forma aislada(320).

## INTRODUCCIÓN

### 2.6.1.2. Factores anatomopatológicos

- **Estadificación TNM**

Está establecido que el sistema TNM, el cual determina el estadio patológico es la herramienta clínica con mayor utilidad en el pronóstico del CCR. La "T" describe la profundidad invasiva del tumor en la pared colorrectal, un factor que influye negativamente en la supervivencia. Los tumores T1 invaden la submucosa, los tumores T2 invaden la muscular propia y los tumores T3 invaden la subserosa. Un tumor T4 invade órganos o estructuras vecinas o perfora el peritoneo visceral. Una categoría T superior se asocia con una menor supervivencia. La afectación ganglionar, "N", también se asocia con una disminución de las tasas de supervivencia. N1 indica metástasis a 1 a 3 ganglios linfáticos, mientras que N2 se define como una diseminación a 4 o más ganglios linfáticos. La metástasis a distancia, M1, a menudo implicará que la enfermedad es incurable con un pronóstico sombrío.

Tabla 12. Sistemas de Clasificación tumoral

Sistema TNM				Sistema		Supervivencia a los 5 ños
Estadio	T	N	M	Dukes	Astler y Coller	
<b>0</b>	Tis	N0	M0	-	-	-
<b>I</b>	T1	N0	M0	A	A	92,5-93,9%
	T2	N0	M0		B1	
<b>II</b>	T3	N0	M0	B	B2	76,4-77,5%
	T4	N0	M0		B3	
<b>III</b>	T1/T2	N1/N2	M0	C	C1	47,1-48,3%
	T3/T4	N1/N2	M0		C2	
<b>IV</b>	T(is-4)	N(0-2)	M1		D	6,1-7,0%



- **Localización tumoral**

La localización del tumor en el colon derecho, en colon izquierdo o recto representa un predictor independiente de diseminación metastásica y, por lo tanto, de SG. Recientemente se ha mostrado que los carcinomas del lado izquierdo tienen un 70% más de riesgo de metástasis hepáticas aisladas, en comparación con la localización derecha y recto(321). Por otro lado, los carcinomas rectales tienen un riesgo de más del 200% de recurrencia local y/o metástasis pulmonares aisladas, en comparación con los carcinomas del lado derecho(322). Además, se ha demostrado que los tumores en sus diferentes localizaciones en el trayecto colorrectal tienen diferentes características genéticas. Por ejemplo, los carcinomas en colon derecho son predominantemente MSI, lo que le confiere un buen pronóstico y mayor supervivencia. Al comparar el carcinoma mucinoso, el carcinoma en anillo de sello y el adenocarcinoma se evidenciaron diferencias significativas en cuanto a ubicación anatómica y a su patrón de diseminación, mostrando que los carcinomas rectales se diseminan con mayor frecuencia a sitios extraabdominales(323). No está claro si las diferencias genéticas, subtipos histológicos o el drenaje venoso o retorno linfático son los que más contribuyen a las diferencias observadas en la diseminación metastásica.

- **Afectación de ganglios linfáticos**

El número de ganglios linfáticos regionales afectados es el segundo factor pronóstico adverso más importante tras las metástasis a distancia y su incidencia guarda relación con la profundidad de la invasión transmural del tumor y el grado histológico. Además de los ganglios afectados, varios estudios han evaluado al número total de ganglios linfáticos analizados como un marcador pronóstico de recidiva. La tasa de supervivencia a 5 años fue del 62% para aquellos con < 8 ganglios examinados, mientras que aquellos con > 17 ganglios linfáticos examinados tuvieron una supervivencia del 76% a 5 años(324). El valor pronóstico del ratio de afectación ganglionar (RAG), definido como el cociente entre ganglios afectados y examinados se ha confirmado, lo cual determina que un RAG elevado se asocia a una supervivencia desfavorable(325). En cuanto a los nódulos satélites, definidos en la clasificación TNM 2010(326) como depósitos tumorales extranodales en la grasa pericólica o el mesenterio adyacente, se consideran equivalentes a las metástasis ganglionares, incluso en ausencia de arquitectura nodal. Su presencia se considera un factor pronóstico adverso(327), capaz de equiparar el pronóstico de la

## INTRODUCCIÓN

enfermedad N0 al del estadio III(328). En los últimos años existe un interés creciente en el valor pronóstico de las micrometástasis ganglionares, definidas como células tumorales aisladas o agrupaciones celulares  $\leq 0.2$  mm en su dimensión mayor detectadas mediante tinciones con hematoxilina/eosina o métodos inmunohistoquímicos, o cualquier evidencia de tumor detectada únicamente mediante métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)(329). Aunque las técnicas moleculares pueden detectar células tumorales ocultas hasta en el 25-50% de los pacientes con ganglios negativos en el análisis histopatológico rutinario, su significado biológico no está aclarado debido a los resultados inconsistentes de los trabajos iniciales(330). Sin embargo, un estudio reciente de 312 pacientes con estadio pN0 observó que el 81% las recaídas se produjeron en los casos en los que se identificaban células tumorales aisladas por inmunohistoquímica(331). Un metaanálisis de 39 estudios también ha confirmado el valor pronóstico adverso de la carga tumoral oculta en los ganglios linfáticos de tumores pN0 evaluada mediante RT-PCR, con independencia del número de ganglios examinados(332). Aunque estos resultados son prometedores, se necesitan estudios prospectivos confirmatorios antes de poder utilizarse para individualizar la indicación de QT adyuvante en pacientes con ganglios negativos(333).

- **Tipo histológico**

Existen subtipos histológicos de adenocarcinoma poco frecuentes, como el adenocarcinoma mucinoso (5% -15%) y el carcinoma de células en anillo de sello (1%). Por lo general, el carcinoma de células en anillo de sello (>50% de células en anillo de sello) se asocia a pacientes más jóvenes, estadios avanzados, peores resultados oncológicos y a una tasa de supervivencia más baja. El adenocarcinoma mucinoso (>50% mucinoso) localizado fundamentalmente en el colon derecho también se asocia a edades tempranas, a tasas de supervivencia más bajas(334), y en algunos estudios se ha sugerido una peor respuesta a la QT. Recientemente se ha reconocido al carcinoma medular como un nuevo tipo histológico, que es poco frecuente constituido por células con un patrón de crecimiento sólido y se asocia frecuentemente a MSI-H, al síndrome de Lynch y a un pronóstico favorable(335).

- **Grado histológico**

El grado histológico describe la diferenciación de las células tumorales y ha demostrado ser un factor pronóstico establecido independiente del estadio tumoral(336). Los tumores bien diferenciados se clasifican como G1 y los tumores moderadamente diferenciados, que son los más comunes, se clasifican como G2, ambos considerados de bajo grado histológico (mayor o igual al 50% de formaciones ganglionares). Los tumores pobremente diferenciados e indiferenciados se clasifican como G3 y G4 respectivamente y son considerados como de alto grado histológico (cordones celulares mal delimitados, con atipia celular marcada y alto índice mitótico). Los tumores con alto grado histológico tienen un peor pronóstico comparados con tumores G1 y G2.

- **Invasión Linfovascular**

La invasión tumoral en venas y vasos linfáticos juega un papel importante en la diseminación hematógena y linfática del tumor. Sin embargo, la frecuencia de esta invasión varía ampliamente entre las diferentes series y puede ser causada por diferencias en la sección del tumor, número de bloques tumorales examinados, uso de tinción especial y variabilidad entre observadores. Existe una asociación positiva entre la invasión linfática y algunas características tumorales como la profundidad, la pobre diferenciación, la gemación tumoral y las metástasis ganglionares(337). Sin embargo, existen resultados contradictorios relacionados con la invasión tumoral en los vasos linfáticos y su asociación con una baja supervivencia. En un estudio se demostró una asociación no significativa con un peor pronóstico al añadirse otros factores de riesgo. La invasión venosa se asocia con una categoría T más avanzada y una profundidad tumoral mayor y a su vez es un marcador pronóstico independiente de metástasis a distancia y menor supervivencia(338). Además, se ha argumentado que la invasión venosa extramural debe utilizarse como un marcador específico al adaptar el tratamiento adyuvante(339). Los trabajos científicos realizados por Dukes y cols. en las décadas de 1940 y 1950, representan los documentos fundamentales relacionados con la diseminación metastásica de las células tumorales a través de los vasos linfáticos(340, 341). Se demostró que la diseminación linfática de las células cancerígenas en el cáncer de recto sigue una ruta distinta y que la tasa de supervivencia se asocia con la amplitud de dicha diseminación. Se diferenciaron cuatro tipos de casos: A, B, C1 y C2. Los casos A y B no presentaron diseminación linfática, mientras que los casos C1 y C2 la presentaron paralelas al trayecto

## INTRODUCCIÓN

arterial. En 1938, mostraron por primera vez que la diseminación linfática sigue un patrón ordenado y distinto, lo cual es importante de tener en cuenta cuando se realiza la disección a lo largo de la fascia mesorrectal. De forma similar, identificó la diseminación venosa en el 11% de todos pacientes con cáncer de recto resecado, y curiosamente, la diseminación era más del doble de frecuente en pacientes con metástasis ganglionares. Es importante tener en consideración que el drenaje venoso del recto siga 2 vías distintas. En el tercio inferior del recto, las venas hemorroidales drenan en las venas ilíacas y luego en la vena cava inferior llegando al corazón derecho y a la circulación pulmonar. Por otro lado, los dos tercios superiores del recto drenan directamente a la vena mesentérica inferior, que luego desemboca en la vena porta antes de su ingreso al hígado. Algunos han argumentado que esta diferencia en el retorno venoso puede afectar el patrón de diseminación metastásica(322). El mesorrecto es la parte del mesenterio que envuelve el recto e incluye la grasa perirrectal, las arterias, el drenaje venoso, los nervios y los vasos linfáticos. La disección cuidadosa de la superficie de la fascia mesorrectal (*holly plane*), una capa de tejido fibroareolar, es la clave para el éxito del tratamiento quirúrgico en el cáncer de recto. Permanecer en el tejido laxo y avascular entre la fascia mesorrectal y endopélvica también minimiza el sangrado y protege la anatomía neurovascular circundante.

- **Invasión perineural**

La invasión perineural se define como el crecimiento directo del carcinoma en el perineuro de los nervios autónomos dentro del plexo mesentérico superior e inferior(342). Según varios ensayos recientes, la ruta de diseminación metastásica es una característica patológica emergente en el CCR(343). Ha sido postulado que esta invasión facilita el movimiento de células cancerígenas desde el sitio del tumor primario a través de vías perineurales produciendo depósitos tumorales en tejidos blandos(344). La invasión perineural puede explicar el pobre pronóstico en pacientes con cáncer de colon derecho con diseminación a los ganglios linfáticos centrales alrededor de los vasos mesentéricos superiores debido a su proximidad al plexo superior mesentérico. La invasión perineural se estima hasta en un 33% en algunos estudios. Recientemente se ha señalado que la invasión perineural se asocia con un pronóstico significativamente peor en el cáncer de recto localmente avanzado; la mediana de supervivencia libre enfermedad fue de 13.5 meses para aquellos con invasión perineural en comparación a los 39.8 meses para aquellos en los que no se observaba dicha invasión. Estos autores sugieren que sus datos

respaldan nuevas evidencias del papel de la quimioterapia adyuvante en pacientes con invasión perineural(343).

- **Patrón de crecimiento tumoral**

El tumor en el frente invasivo puede adoptar un patrón de crecimiento infiltrativo, cuando penetra de forma difusa en el tejido sano adyacente, o expansivo, cuando el límite tumor-estroma está bien circunscrito(345). La configuración infiltrativa, presente en el 17-80%, ha demostrado ser un factor pronóstico adverso independiente(346), lo que podría explicarse por reflejar una menor respuesta inflamatoria del huésped frente al tumor(347) y por su frecuente asociación con características moleculares relacionadas con un comportamiento tumoral agresivo, como la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup> o la ausencia de MSI-H(348). Otros trabajos también han encontrado asociación entre la presencia de células tumorales indiferenciadas aisladas o agrupadas en pequeños focos en la inmediata vecindad del frente invasivo, lo que se ha denominado “brote tumoral” o “desdiferenciación focal” (*tumour budding*)(349) y una supervivencia desfavorable(25).

- **Fibrosis peritumoral y respuesta inflamatoria**

La respuesta desmoplásica del estroma es una característica común del CCR invasivo y un factor pronóstico adverso en algunos(350), aunque no en todos(351), los estudios. Por otra parte, la infiltración linfoide intratumoral constituye un factor pronóstico favorable en la mayoría de los trabajos(352). En concreto, la presencia de una densidad alta de células T CD8<sup>+</sup> y CD45RO<sup>+</sup> se ha asociado con una mejoría de la supervivencia(353). Recientemente, se ha demostrado que la alta densidad de linfocitos T reguladores posee un valor pronóstico independiente más potente que el de las células CD8<sup>+</sup> y CD45RO<sup>+</sup>(354). Estos datos sugieren que la respuesta inflamatoria reflejaría que los mecanismos de defensa del huésped están operativos, aunque no existen datos directos que confirmen esta hipótesis. También se ha sugerido que la infiltración linfoide puede representar un marcador pronóstico favorable debido a su asociación con MSI-H(355), aunque algunos estudios han demostrado que el valor pronóstico de ambos es independiente(356).

## INTRODUCCIÓN

### 2.6.1.3. Factores Quirúrgicos

- **Márgenes de resección**

En el cáncer de colon las recidivas locales son excepcionales cuando los márgenes proximal y distal son mayores de 5 centímetros. En cuanto al margen de resección circunferencial, varios autores han trasladado el concepto de ETM a la cirugía del cáncer de colon, demostrando que la excisión completa del mesocolon, definida como la separación de éste del plano parietal y la ligadura de las arterias y venas de drenaje en su origen, reduce las tasas de recidiva local y mejora la SG(357).

- **Tumor residual**

La presencia de tumor residual tras la cirugía es un factor pronóstico adverso ampliamente validado(358), que depende tanto del estatus de los márgenes quirúrgicos como de cualquier evidencia de tumor no resecado. La designación R indica la presencia de tumor residual local tras un tratamiento potencialmente curativo y es un término apropiado sólo en caso de enfermedad M0. La Tabla 13 resume las tres categorías de enfermedad residual (R0, R1 y R2) de la clasificación TNM 2010(326).

Tabla 13. Categorías de enfermedad residual en la clasificación TNM(326).

CATEGORIA	CONCEPTO
<b>R0</b>	Resección tumoral completa, sin evidencia de tumor residual en los márgenes quirúrgicos
<b>R1</b>	Resección tumoral incompleta, evidencia de tumor residual y/o afectación microscópica de los márgenes quirúrgicos
<b>R2</b>	Resección tumoral incompleta, evidencia de enfermedad residual macroscópica del tumor primario, ganglios regionales y/o márgenes quirúrgicos.

### 2.6.1.4. Factores Moleculares

A pesar de los datos prometedores iniciales que relacionaban a los marcadores moleculares con el pronóstico y definían grupos de alto riesgo de recidiva, no se ha identificado hasta la fecha un marcador o un perfil molecular con capacidad predictiva que permita identificar los casos de CCR con mayor posibilidad de beneficiarse de la QT adyuvante.

- **Inestabilidad de microsátélites**

Se ha demostrado que la MSI es un factor de pronóstico positivo independiente tras una resección R0. La mayoría de los trabajos concluyen que los tumores con MSI-H presentan una menor tasa de recidivas, fundamentalmente a distancia, y una SLE significativamente mayor que aquellos tumores MSS(145). En cuanto al papel de la MSI como marcador predictivo de respuesta a la QT adyuvante, algunos estudios demuestran que el tratamiento adyuvante con 5-FU mejora significativamente la supervivencia de los pacientes con CCR estadio II-III e MSI-L o MSS(359). Respecto al papel del oxaliplatino, no hay estudios prospectivos que hayan evaluado el beneficio de la adyuvancia con este fármaco en pacientes con MSI-H. Sin embargo, la mayoría de los análisis retrospectivos realizados sugieren que el oxaliplatino adyuvante proporcionaría un beneficio independiente del estatus MMR, fundamentalmente en los estadios III y en los tumores proximales(360). Finalmente, datos preclínicos y clínicos recientes sugieren que los tumores con MSI-H podrían tener una mayor sensibilidad a irinotecán, lo que se explicaría por la deficiencia en los mecanismos de reparación implicados en las roturas de doble cadena inducidas por el fármaco. Así, un subanálisis del estudio CALGB 89803, en el que se evaluó el beneficio de añadir irinotecán a 5-FU bolus/LV en pacientes con CCR estadio III, ha demostrado una tendencia hacia una SLE favorable en los enfermos con MSI-H tratados con la combinación (HR=0.52; p=0.07)(363). Sin embargo, el estudio PETACC-3 no ha confirmado estos resultados en pacientes con estadios II y III, ya que la adición de irinotecán al 5-FU infusión continua/LV no mejoró el pronóstico de los pacientes con MSI-H respecto a los tumores MSS. Los datos contradictorios de estos dos estudios pueden explicarse por las diferencias en la inclusión de pacientes con estadio II y en la definición de tumores con MSI-H. En base a los resultados descritos, parecer razonable testar el estatus MMR en los pacientes con CCR estadio II en los que se

## INTRODUCCIÓN

considera la administración de QT adyuvante con 5-FU, así como obviar dicho tratamiento en los tumores MSI-H y riesgo estándar de recidiva, teniendo en cuenta su pronóstico favorable y la ausencia de beneficio con la terapia adyuvante. La decisión en los estadios II de alto riesgo debe individualizarse en función de los riesgos y preferencias del paciente. El manejo óptimo de los estadios III con MMR es más complejo ya que múltiples estudios han demostrado el beneficio de la adyuvancia con 5-FU, y en la actualidad no debe considerarse MSI como un marcador validado para establecer las decisiones terapéuticas en esta población.

- **Mutaciones *KRAS***

La mayoría de los estudios demuestran una concordancia mayor del 95% entre el estatus mutacional del tumor primario y sus metástasis. El impacto pronóstico de la mutación *KRAS* en los estadios II-III es controvertido, ha sido objeto de estudio, pero los resultados son contradictorios siendo su valor pronóstico aún incierto(361). Dos metaanálisis demostraron que su presencia en estadios iniciales es un factor pronóstico adverso(362), siendo el impacto más evidente en el caso de la mutación G12V (GTT) y en los estadios III. Posteriormente un estudio (QUASAR)(363) y varios estudios recientes de pacientes tratados con esquema FOLFOX+/-cetuximab(364) también evidenciaron una supervivencia inferior en presencia de mutaciones en este gen. Sin embargo, otros grandes estudios de adyuvancia (CALGB 89803(365) y el PETACC-3(366)), no han podido confirmar estos datos al no encontrar diferencias en supervivencia en pacientes con estadio II-III en función del estatus *KRAS*. Por otra parte, aunque la mutación *KRAS* es un predictor reconocido de ausencia de respuesta a las terapias anti-EGFR en el CCRm, la mayoría de los estudios en el contexto adyuvante no han encontrado asociación entre el estatus de *KRAS* y el beneficio de la QT adyuvante con 5-FU. Los resultados de algunos trabajos sugieren que la presencia de mutaciones *KRAS* en plasma(367) o en ganglios linfáticos histológicamente negativos en el CCR estadio II(332) se asocian con un mayor riesgo de recidiva en pacientes sometidos a cirugía curativa, por lo que podría ser de utilidad en la identificación de pacientes candidatos a recibir tratamiento adyuvante.



Las vías de activación de las MAP quinasas y m-TOR juegan un importante papel regulador del crecimiento celular. La activación del receptor de membrana EGF por la unión a ligandos procrecimiento activa las cascadas RAS-RAF-MAPK y PI3K-AKT-mTOR, las cuales promueven la proliferación, invasión, migración y vascularización tumoral. Mutaciones específicas en proto-oncogenes de esta vía como KRAS, BRAF o PIK3CA conducen a una expresión constitutiva independiente de la activación de EGF que provoca el crecimiento celular sostenido.

Diferentes estudios citan una frecuencia mutacional en CCR del 32-45% para KRAS, del 6-17% para BRAF y del 3-21% para PIK3CA. La inmensa mayoría de estas mutaciones se encuentran en hotspots: los codones 12 y 13 de KRAS, el cambio V600E de BRAF y los exones 9 y 20 de PIK3CA. La identificación de estas mutaciones en tumores tiene además un gran valor diagnóstico, puesto que revela las vías alteradas y acota las dianas más efectivas en las que centrar el tratamiento. Por otro lado, el estudio de mutaciones en TP53 es también de gran interés debido a las funciones del gen como supresor tumoral: interviene en la capacidad de detención del ciclo celular, la regulación de la entrada en senescencia o apoptosis o la activación de la reparación del ADN, entre otras. Alrededor del 40-55% de los CCRs presentan mutaciones en este gen. Debido a la naturaleza de supresor tumoral de p53, y a diferencia de KRAS, BRAF y PIK3CA, las mutaciones conductoras se distribuyen a lo largo de todo el gen, aunque también existen puntos calientes con frecuencia mutacional incrementada. La diversidad de técnicas utilizadas, así como la variabilidad en la zona cubierta en cada estudio, hace difícil poder establecer un porcentaje de mutación para cada gen en este grupo de tumores. Sin embargo, KRAS parece encontrarse mutado en al menos un cuarto de los casos analizados, mientras que para BRAF la frecuencia se muestra claramente inferior (0-13%).

- **Mutaciones *BRAF***

*BRAF* es un protooncogén y miembro de la familia cinasa RAF(361), que codifica una serin-treonina quinasa incluida en la vía de señalización RAS-RAF-MAP2K(MEK)-MAPK(368), la cual afecta a la proliferación celular, la detención del ciclo celular, la diferenciación del terminal y la apoptosis. Las mutaciones *BRAF*, mutuamente excluyentes con las mutaciones *KRAS*, se encuentran presentes en el 10% al 15% en el CCR y en el 34%-70% de los tumores esporádicos con IMS-H(369). La sustitución V600E es la alteración más predominante (más del 95%). Un metaanálisis concluyó que

## INTRODUCCIÓN

las mutaciones *BRAF*<sup>V600E</sup> se asocian a edad avanzada, sexo femenino, localización en colon derecho, IMS, metilación de MLH1 y características patológicas de mal pronóstico, como la histología pobremente diferenciada y mucinosa o con un estadio TNM más avanzado(370). Existen varios estudios que respaldan un impacto adverso del pronóstico de la mutación *BRAF*, especialmente en tumores con MSS. De igual forma a lo que ocurre con las mutaciones *KRAS*, hasta la fecha son pocos los estudios que han evaluado su valor de las mutaciones *BRAF* en relación con la eficacia de los esquemas de QT adyuvante. En algunos estudios (QUASA(363) y PETACC-3(366)) el estatus mutacional *BRAF* no predice el beneficio del tratamiento con 5-FU, mientras que otro estudio (CALGB 89803), si evidenció una SG favorable en los tumores *BRAF* *wild-type*, aunque sin encontrarse diferencias significativas con los tumores con mutaciones *BRAF*.

- **Mutaciones *PIK3CA***

*PIK3CA* un oncogén que pertenece a la familia de las PI3K, estas quinasas que promueven diversos procesos biológicos, incluyendo la proliferación celular y su supervivencia codifican la subunidad catalítica de la fosfoinositida-3 quinasa (PI3K). Las mutaciones *PIK3CA* se encuentran en el 10% al 20% del CCR, aunque se han identificado en muchos tumores sólidos(371). Se asocian a características y eventos moleculares específicos como la localización proximal del tumor, MSI-H y *KRAS* mutado. En un metaanálisis reciente se ha señalado que la mutación *PIK3CA* tiene un efecto neutral sobre la SG y la SLE en el CCR(372).

## **JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

## JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En España, como en muchos países occidentales, el cáncer es en la actualidad una de las enfermedades de mayor relevancia sobre todo por la alta tasa de morbilidad y mortalidad que genera y su alto coste sanitario. La mayoría de los estudios indican un aumento en la incidencia del CCR en las últimas décadas, sobre todo en pacientes jóvenes, por lo que los estudios moleculares para la detección de mutaciones genéticas y epigenéticas representan hoy en día una alternativa de importancia clínica.

Se ha descrito la influencia de factores de riesgo genéticos y ambientales en la etiología del CCR, por lo que es necesario establecer una evidencia científica adecuada y proponer medios de información poblacional para conseguir una mayor aceptación e impacto de los programas de prevención y diagnóstico precoz. Se ha demostrado que el pronóstico de esta enfermedad está íntimamente ligado a la extensión tumoral en el momento de realizar el primer tratamiento con intento curativo, además, en los últimos años se ha comprobado la importancia de la detección de mutaciones predictivas de respuesta a la terapia adyuvante sobre todo en pacientes con CCRm.

Aunque actualmente se cuenta con un armamento importante en métodos diagnósticos, resulta fundamental establecer de forma óptima la indicación y la modalidad de los tratamientos neoadyuvante y adyuvante de acuerdo con la localización y el estadio clínico y radiológico tumoral. Aún no hay estudios determinantes en cuanto a la localización y el tipo molecular del tumor para obtener mejores resultados en SG y SLE, pero cada vez es más importante clasificar a los pacientes según estos valores para establecer tratamientos más dirigidos.

Consideramos que cualquier técnica que ayude a fortalecer y mejorar los métodos de detección precoz o de diagnóstico ya establecidos son determinantes, no sólo por su capacidad de diagnóstico temprano, si no también por la capacidad de brindar un tratamiento más personalizado y eficaz en las poblaciones de riesgo intermedio y alto.

El interés final de este estudio es desarrollar y establecer mediante técnicas moleculares una prueba complementaria de utilidad diagnóstica y terapéutica en pacientes con CCR. Este enfoque podría traducirse en una mejora en el pronóstico de estos pacientes.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### 1. HIPÓTESIS

La ddPCR tiene una alta sensibilidad para la detección de alelos mutados del gen *KRAS* en el ADN obtenido en muestras fecales en pacientes con CCR.

### 2. OBJETIVOS

#### 2.1. Objetivo principal

Evaluar la capacidad de detectar la mutación G12D del gen *KRAS* en ADN proveniente de muestras fecales mediante ddPCR en pacientes con CCR.

#### 2.2. Objetivos secundarios

Analizar la capacidad de obtención, en cantidad y pureza, de ADN humano en muestras fecales en pacientes diagnosticados de CCR.

Determinar la incidencia de la mutación G12D del gen *KRAS* en ADN proveniente de tejido tumoral mediante pirosecuenciación, en pacientes con CCR.

Analizar la capacidad de detectar la mutación G12D del gen *KRAS* en ADN proveniente de tejido tumoral mediante ddPCR, en pacientes con CCR y correlacionarlo con los resultados obtenidos mediante pirosecuenciación.

Comparación de mutaciones del gen *KRAS* según localización del tumor primario y su pronóstico mediante el seguimiento clínico postoperatorio.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 1. DISEÑO

Realizamos un estudio observacional prospectivo en pacientes con diagnóstico histológico de adenocarcinoma colorrectal en diferentes estadios clínicos que ingresaron para tratamiento quirúrgico con fines curativos en el Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz durante el período comprendido entre los años 2014 y 2015. Todos los sujetos firmaron un consentimiento informado de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Clínica de esta institución (PIC 63 / 2016\_FJD).

#### 1.1. Selección de pacientes

##### 1.1.1 Criterios de inclusión

- Confirmación histológica de CCR en muestras de tejido tumoral obtenidas mediante biopsia endoscópica.
- Resección quirúrgica del tumor primario con intención potencialmente curativa.
- Disponibilidad de muestra tumoral conservada en parafina
- Estudio clínico preoperatorio completo.
- Consentimiento informado del paciente.

##### 1.1.2 Criterios de exclusión

- Tumores primarios con tratamiento de QT o radioterapia neoadyuvante.
- Pacientes con diagnóstico de CCR complicada sometidos a cirugía de forma urgente

#### 1.2. Tamaño muestral

Se estableció el tamaño muestral mediante el cálculo de la media anual de pacientes diagnosticados de CCR dos años previos al inicio del estudio.



### 1.3. Recogida de datos

Se seleccionaron una serie de variables de interés para el estudio.

#### **Variables demográficas**

- Edad
- Sexo

#### **Antecedentes personales**

- Diabetes mellitus tipo 2
- Hipertensión arterial
- Dislipemia
- IMC

#### **Síntomas clínicos**

- Hemorragia digestiva baja
- Estreñimiento
- Anemia
- Síndrome constitucional
- Dolor abdominal
- Tenesmo rectal

#### **Localización del tumor primario**

- Todos los pacientes se dividieron en subgrupos de acuerdo con la localización del tumor primario, establecida por la distancia entre la lesión tumoral y el margen anal (cm) descrito en la colonoscopia preoperatoria. Se definieron los subgrupos: colon **DERECHO**: lesión tumoral entre la válvula ileocecal hasta ángulo esplénico de colon; colon **IZQUIERDO**: lesión tumoral entre el ángulo esplénico del colon hasta zona rectosigmoidea y **RECTO**: lesión tumoral entre zona rectosigmoidea hasta margen anal.

### **Estudio Anatomopatológico**

- Clasificación pTNM
- Clasificación de Dukes y Astler-Coller
- Tipo histológico
- Grado de diferenciación
- Tamaño tumoral
- Metástasis ganglionares
- Invasión perineural y/o vascular

### **Seguimiento postoperatorio**

- Tiempo libre de enfermedad
- SG

### **1.4. Análisis moleculares**

- Estudio de pirosecuenciación en muestras de tejido tumoral
- Estudio de ddPCR en muestras de tejido tumoral
- Estudio de ddPCR en muestras fecales

## **2. Metodología**

### **2.1. Recolección de muestras**

#### **2.1.1. Obtención de muestras fecales**

Todas las muestras fecales se recolectaron durante la hospitalización prequirúrgica y previo a la preparación. Las muestras se recolectaron en recipientes estériles y se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

#### **2.1.2. Obtención de muestras de tejido tumoral**

Todas las muestras de tejido tumoral se extrajeron de las piezas quirúrgicas inmediatamente después de su extirpación y se transportaron de acuerdo con la

metodología anatomopatológica estándar para garantizar la calidad de las muestras (libres de formol).

## **2.2. Extracción de ADN**

### **2.2.1. Extracción en muestras de tejido tumoral FFPE para análisis mediante pirosecuenciación.**

Se raspó con bisturí seco el tejido tumoral de las secciones quirúrgicas y se depositaron en tubos de microcentrífuga utilizando un bisturí seco para cada muestra. Se fijaron las muestras de tejido en formalina con tapón neutral al 10% y en parafina. Se utilizó el QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN) de acuerdo con el protocolo del fabricante para la purificación del ADN en muestra de tejido FFPE. El ADN genómico pudo conservarse a 2-8 °C durante 1 semana con posterioridad a la extracción y, luego, a una temperatura comprendida entre -15 y -25 °C durante 8 semanas antes de su uso.

### **2.2.2. Extracción en muestras de tejido tumoral FFPE y muestras fecales para análisis mediante ddPCR.**

El ADN presente en las muestras de heces se aisló utilizando el kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, con mínimas modificaciones. Las muestras fecales congeladas se mantuvieron en hielo para evitar su descongelación durante su manipulación. Se separaron pequeños fragmentos de la muestra utilizando un bisturí estéril y se introdujeron en tubos estériles, también en hielo, para pesarlos en una balanza de precisión. Se realizaron pruebas partiendo aproximadamente 200 mg de muestra según las recomendaciones del fabricante del kit de extracción, pero en aquellos casos en los que se obtuvo un rendimiento bajo de ADN o un bajo número de eventos en la ddPCR, se repitió la extracción utilizando alrededor de 500 mg de partida. El ADN de la línea celular LS-174T (proporcionado por la División de Oncología Traslacional, Instituto OncoHealth, IIS-FJD, que previamente había adquirido esta línea celular a través de la Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC en Manassas, VA, Estados Unidos) y el ADN de las células mononucleares de sangre periférica de un donante sano se extrajeron con el QIAamp DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN de los tumores fijados

con formalina y embebidos en parafina (FFPE) se extrajo usando el kit de preparación de muestras de ADN Cobas (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad y pureza del ADN obtenido se estimó mediante NanoDrop (Espectrofotómetro UV-Vis ND-2000, Nanodrop Technologies Inc., Waltham, MA, Estados Unidos).

### **2.3. Detección de mutaciones de *KRAS***

#### **2.3.1. Detección en muestras de tejido tumoral FFPE mediante pirosecuenciación.**

El análisis de las mutaciones de *KRAS* en las muestras de tejido tumoral FFPE se realizó mediante pirosecuenciación de acuerdo con la práctica habitual en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, utilizando el kit Therascreen *KRAS* Pyro marcado CE-IVD (Qiagen), según los protocolos del fabricante. Cada producto de PCR se analizó mediante pirosecuenciación usando los reactivos Therascreen *KRAS* Pyro (Qiagen), Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Suecia) y un instrumento PyroMark Q24 (Qiagen).

#### **2.3.2. Detección en muestras de tejido tumoral FFPE y muestra fecales mediante ddPCR.**

Los ensayos de ddPCR se realizaron usando el sistema de PCR digital en gotas “QX200™ Droplet Digital™ PCR” (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) con el ensayo de detección de mutaciones ddPCR™ Prime-PCR™ (Bio-Rad). El tamaño del amplicón fue de 57 pb. La mezcla de reacción de PCR (20 µL) contenía 10 µL de ddPCR Supermix para sondas (sin dUTP), 1 µL de cada mezcla de cebador/sonda (diana y referencia, marcadas con fluoróforos HEX y FAM, respectivamente) y 2-6 µL de muestra (ADN). Esta mezcla se cargó en los pocillos centrales del cartucho (DG8™ Cartridge), seguida de 70 µl de aceite de generación de gotas para sondas en los pocillos destinados a ello. El cartucho se cubrió con una goma o “gasket” y se introdujo en el generador de gotas (QX200 Droplet Generator). Tras la formación de la emulsión, los 40 µl de las suspensiones de gotas se transfirieron a una placa de 96 pocillos con una pipeta

multicanal. La placa se selló con un papel de aluminio perforable en un sellador por calor PX1™ PCR Plate Sealer (Bio-Rad) y se introdujo en un termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad). El ciclo térmico consistió en 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 94 °C durante 30 s, y 55 °C durante 60 s (Tabla 14).

**Tabla 14. Condiciones del ciclo térmico** \*Se seleccionó una temperatura de 105°C para el cierre y un volumen de muestra de 40 µL.

<b>Etapas del ciclo térmico</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Velocidad de rampa</b>	<b>Número de ciclos</b>
<b>Activación de la enzima</b>	95	10 min	2°C/seg	1
<b>Desnaturalización</b>	94	30 seg		40
<b>Anillamiento/extensión</b>	55	1 min		40
<b>Inactivación de la enzima</b>	98	10 min		1
<b>Conservación</b>	4	∞		1

Tras el ciclo térmico, la placa se transfirió al lector de gotas QX200 Droplet Reader (Bio-Rad), donde se analizó la emisión de fluorescencia de FAM y HEX gota a gota, haciendo una clasificación binaria de las gotas positivas y negativas. Los resultados se analizaron utilizando el software Quantasoft v.1.7 (Bio-Rad) y se expresaron como número de copias por reacción de 20 µL, así como copias por ng de ADN.

El ADN de LS-174T, una línea celular heterocigótica *KRAS* G12D de adenocarcinoma de colon humano, se usó como control positivo. El ADN de control *KRAS* WT se obtuvo a partir de células mononucleares de sangre periférica de un donante sano, utilizando una cantidad total de 100 ng de ADN de estos controles derivados de células por pocillo. En el caso del ADN de los tumores FFPE, se usaron 50 ng por pocillo. Se realizaron pruebas con diferentes cantidades de ADN derivado de heces de cada muestra, ya que la proporción de ADN humano con respecto al ADN bacteriano es desconocida y puede variar entre los pacientes. El fondo se midió añadiendo agua a la mezcla de reacción en lugar de ADN. Se analizaron de tres a cuatro réplicas de cada muestra de heces. Los tumores y controles FFPE se analizaron por duplicado.

### 3. Análisis Estadístico

Las variables cualitativas se definieron mediante número de casos y porcentaje. Las pruebas cuantitativas fueron definidas mediante media y desviación típica, cuando seguían una distribución normal, y mediana y rango cuando no presentaban esta distribución. Se evaluó si las variables seguían una distribución gaussiana mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y si cumplían una distribución en campana de Gauss.

Para el estudio analítico, se utilizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney para analizar la significación estadística utilizando el programa informático R (versión 3.5.3). El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ . El análisis de supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan – Meier y se compararon mediante las pruebas del *long-rank*, de Breslow y de Tarone-Ware.

## **RESULTADOS**

## 1. Descriptivos

### 1.1. Aspectos Clínicos

Se recolectó e incluyó en el estudio las muestras de tejido tumoral FFPE y muestras fecales de un total de 70 pacientes con CCR. Se dividieron los subgrupos según la localización del tumor primario: 26 en colon DERECHO (37,2%), 36 en colon IZQUIERDO (51,4%) y 8 en RECTO (11,4%) tal como se muestra en la Figura 20.

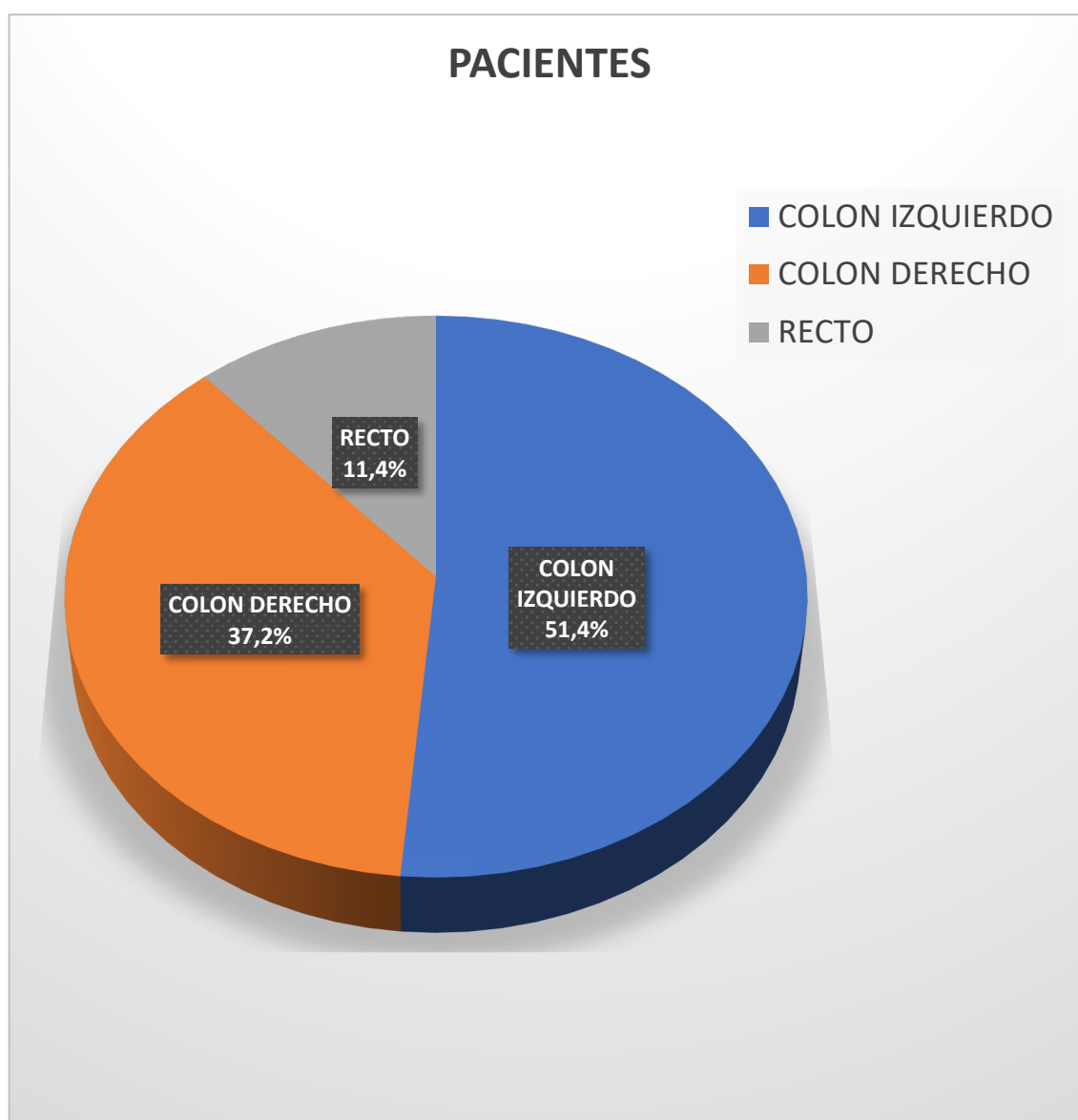


Figura 20. Distribución de pacientes según localización de tumor primario



## RESULTADOS

En los 70 pacientes incluidos en el estudio, existió un predominio en número de hombres (58,6%) frente a mujeres (41,4%) con una edad media global de 73,3 +/- 5 años. La distribución de la edad media y sexo de acuerdo con la ubicación de la lesión tumoral se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Características epidemiológicas

PACIENTES					TOTAL
Ubicación		DERECHO	IZQUIERDO	RECTO	
Sexo	Mujeres	11	15	3	29 (41,4%)
	Hombres	15	21	5	41 (58,6%)
Edad (media)		76,9	72,3	70,6	73,3+/- 5

En la Tabla 16 se describe la prevalencia de diferentes factores de riesgo, la presencia de SOH y los síntomas y signos previos a la cirugía distribuidos según la localización del tumor primario. Dentro de los factores de riesgo, la HTA fue el antecedente más prevalente (64,3%) en las diferentes localizaciones, seguido de la DL (48,5%) y en menor proporción la DM2 (31,4%). No se encontraron diferencias marcadas en cuanto a la prevalencia de obesidad calculada por el IMC en las tres localizaciones, siendo el promedio global de IMC de 25,3 (Sobrepeso grado I). Por otro lado, dentro de la sintomatología previa a la cirugía presentada por los pacientes, la anemia fue el signo más predominante (61,4%), siendo más marcada en tumores localizados y descritos como derechos. Tanto la rectorragia, estreñimiento y el dolor abdominal fueron síntomas con la misma prevalencia, aunque en una proporción baja (27,1%). En el 31,4% del total de pacientes se constató la prueba de SOH positiva, no observándose marcadas diferencias según la localización del tumor primario.

Tabla 16. Antecedentes clínicos y analíticos

	DERECHO	IZQUIERDO	RECTO	TOTAL
<b>Antecedentes</b>				
<b>Diabetes tipo II</b>	7	13	2	<b>22 (31,4%)</b>
<b>Hipertensión</b>	21	20	4	<b>45 (64,3%)</b>
<b>Dislipemia</b>	14	17	3	<b>34 (48,5%)</b>
<b>IMC (media)</b>	26,5	26,3	23,1	<b>25,3</b>
<b>Clínica</b>				
<b>Rectorragia</b>	3	11	5	<b>19 (27,1%)</b>
<b>Estreñimiento</b>	7	10	2	<b>19 (27,1%)</b>
<b>Anemia</b>	22	20	1	<b>43 (61,4%)</b>
<b>Dolor abdominal</b>	8	8	3	<b>19 (27,1%)</b>
<b>Pruebas complementarias</b>				
<b>SOH</b>	11	10	1	<b>22 (31,4%)</b>

SOH: sangre oculta en heces, IMC: índice de masa corporal

## 1.2. Aspectos anatomopatológicos

En la Tabla 17 se detalla la descripción de anatomía patológica de las piezas quirúrgicas distribuidas según la localización del tumor primario. No hubo diferencias marcadas en cuanto a las medias del tamaño tumoral, siendo la media de diámetro global de 4 cm. De acuerdo con la *World Health Organization's histological classification*, el tipo histológico predominante en nuestra muestra fue el adenocarcinoma invasivo (94,3%), siendo el adenocarcinoma mucinoso (mucina en más del 50%) descrito en solo en 4 pacientes (5,7%), de estos se observaron 3 episodios en colon derecho y 1 episodio en recto. El grado de diferenciación predominante fue G2 (moderadamente diferenciado) con un 88,6%, seguido de G1, G3 y G4 con un 7,1%, 2,9% y 1,4% respectivamente. En cuanto a la linfadenectomía observada en las piezas quirúrgicas, en las muestras de colon (derecho e izquierdo) se constató una linfadenectomía oncológicamente aceptable (ganglios extirpados (GE) mayor de 15) en el 71%, mientras que en tumores rectales se

## RESULTADOS

observó una linfadenectomía oncológicamente aceptable (GE mayor de 12) en el 62,5%. El porcentaje de ganglios afectados según la localización derecha, izquierda y recto fue del 30,7%, 30,6% y 0% respectivamente.

La invasión perineural fue observada en mayor porcentaje en tumores localizados en colon izquierdo (19,4%) seguidos de tumores rectales (12,5%) y de localización izquierda (11,5%), mientras que la invasión linfovascular fue predominante en tumores localizados en colon derecho (19,2%).

**Tabla 17. Descripción anatomopatológica**

		DERECHO	IZQUIERDO	RECTO	TOTAL
<b>TAMAÑO TUMORAL</b>	<b>MEDIA(CM)</b>	3	4,5	4,5	<b>4</b>
<b>TIPO HISTOLOGICO</b>	<b>ADENOCA INVASIVO</b>	23	36	7	66 (94,3%)
	<b>MUCINOSO (MÁS 50%)</b>	3	0	1	4 (5,7%)
<b>GRADO DE DIFERENCIACIÓN</b>	<b>G1</b>	3	1	1	5 (7,1%)
	<b>G2</b>	22	33	7	62 (88,6%)
	<b>G3</b>	1	1	0	2 (2,9%)
	<b>G4</b>	0	1	0	1(1,4%)
<b>LINFADENECTOMIA</b>	<b>MAYOR DE 15</b>	20	24		44 (71%)
	<b>MENOR DE 15</b>	6	12		18 (29%)
	<b>MAYOR DE 12</b>			5	5 (62,5%)
	<b>MENOR DE 12</b>			3	3 (37,5%)
	<b>GANGLIOS AFECTOS (%)</b>	30,7%	30,6%	0%	
<b>INVASION (%)</b>	<b>PERINEURAL</b>	11,5%	19,4%	12,5%	
	<b>LINFO-VASCULAR</b>	19,2%	16,7%	0%	

Del total de pacientes, 45 (64,3%) fueron diagnosticados en etapas precoces de la enfermedad (0-IIA), en estos casos se observó un predominio en tumores de lado izquierdo (n=21, 46,67%). Del total de pacientes en estadios intermedios (IIIA-C) (n=19,

27,1%), la mayoría de los tumores también se localizaban en el lado izquierdo (n=10, 52,6%). Solo 3 (4,3%) casos del total de pacientes incluidos en el estudio presentaron lesiones metastásicas al diagnóstico. En la Tabla 18 se muestra la estadificación mediante el sistema TNM y la clasificación de Dukes modificada (Astler-Coller) distribuidos según la localización del tumor primario.

**Tabla 18. Estadificación tumoral según TNM y clasificación de Dukes modificada por Astler- Coller.**

		<b>DERECHO</b>	<b>IZQUIERDO</b>	<b>RECTO</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Estadio TNM</b>	<b>0</b>	2	0	0	<b>2</b>
	<b>I</b>	7	9	5	<b>21</b>
	<b>IIA</b>	7	12	3	<b>22</b>
	<b>IIB</b>	1	1	0	<b>2</b>
	<b>IIC</b>	0	1	0	<b>1</b>
	<b>IIIA</b>	0	1	0	<b>1</b>
	<b>IIIB</b>	5	8	0	<b>13</b>
	<b>IIIC</b>	3	2	0	<b>5</b>
	<b>IV</b>	1	2	0	<b>3</b>
<b>Estadio Dukes Modificada (Astler- Coller)</b>	<b>IN SITU</b>	2	0	0	<b>2</b>
	<b>A</b>	0	3	3	<b>6</b>
	<b>B1</b>	7	6	2	<b>15</b>
	<b>B2</b>	8	13	3	<b>24</b>
	<b>B3</b>	0	1	0	<b>1</b>
	<b>C1</b>	0	1	0	<b>1</b>
	<b>C2</b>	8	8	0	<b>16</b>
	<b>C3</b>	0	1	0	<b>1</b>
	<b>D</b>	1	2	0	<b>3</b>

## RESULTADOS

### 2. Moleculares

#### 2.1. Análisis de mutaciones *KRAS* en muestras de tejido FFPE

El servicio de Anatomía Patológica extrajo el ADN del total de muestras de tejido FFPE, las cuales se utilizaron en la detección de mutaciones de *KRAS* mediante pirosecuenciación y ddPCR.

##### 2.1.1. Análisis mediante pirosecuenciación

Del total de 70 pacientes, se detectó mediante pirosecuenciación la mutación del gen *KRAS* en 33 muestras de tejido tumoral FFPE (47,1%) y 37 fueron catalogadas como *KRAS wild-type* (52,9%). Los distintos tipos de mutaciones detectadas y su prevalencia se describen en el apartado 2.1.1.2 (Tabla 20).

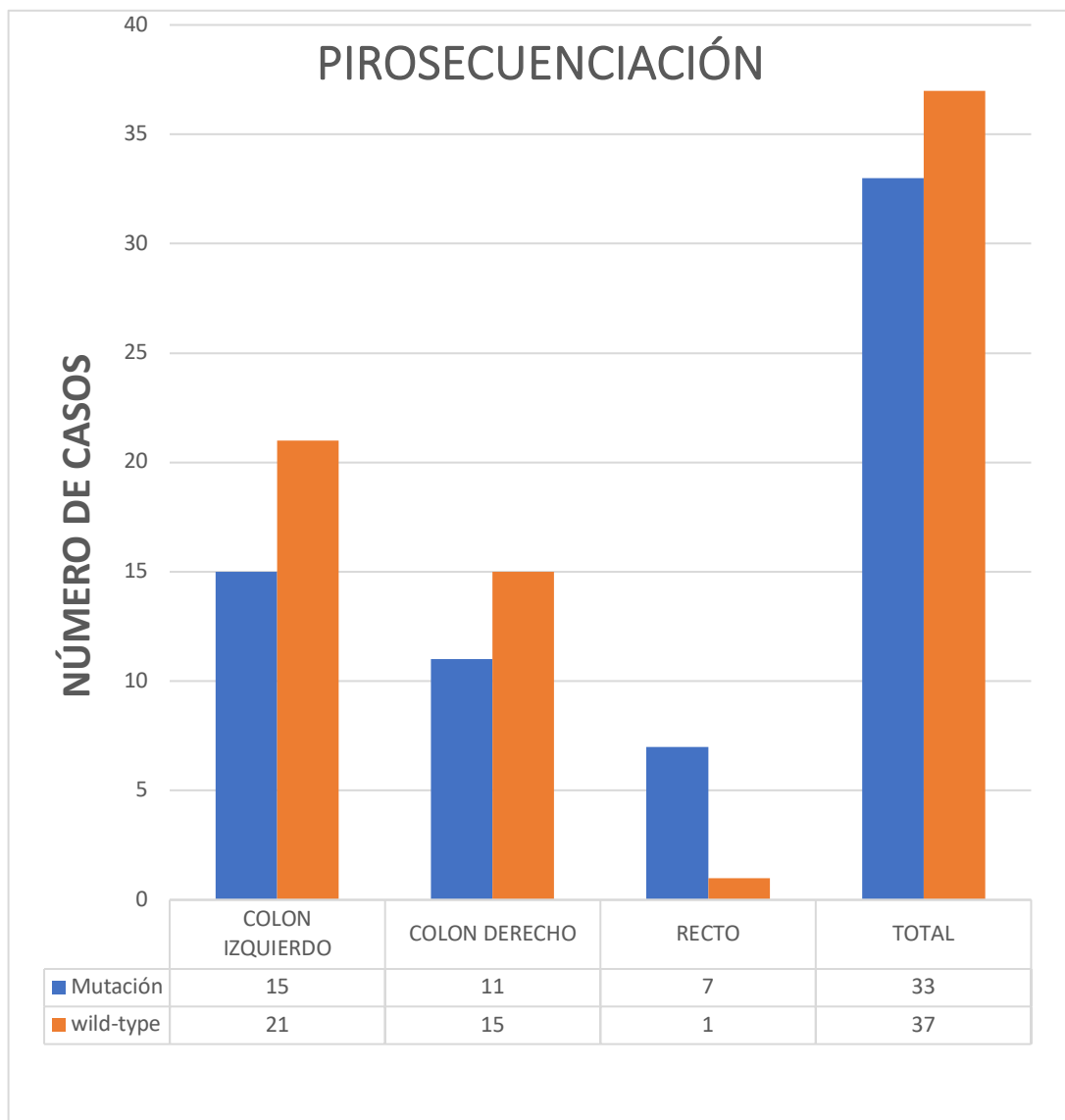
##### 2.1.1.1. Características clínicas según el tipo de mutación

De las 33 muestras con mutaciones en el gen *KRAS*, 11 (33,3%) presentaban una localización en colon derecho, 15 (45,5%) en el izquierdo y 7 (21,2%) en el recto. En la Figura 21 se muestra la distribución en número del estado mutacional de *KRAS* según la localización del tumor primario.

De un total de 29 mujeres y 41 hombres, 16 (55,2%) y 17 (41,5%) de cada género tuvieron *KRAS* mutado, respectivamente. Entre los pacientes con el tipo histológico de adenocarcinoma invasivo, 36 (54,5%) presentaron *KRAS wild-type* y 30 (45,5%) presentaban la mutación.

Tres (75%) de un total de 4 pacientes con el tipo histológico de adenocarcinoma mucinoso presentaron alguna mutación de *KRAS*. No se observaron grandes diferencias entre los grupos de *KRAS wild-type* y *KRAS* mutado en términos de género, grado de diferenciación, tamaño tumoral, afectación ganglionar e invasión perineural y linfovascular.

Cuando los pacientes se dividen en grupos de edad (menor o mayor de 40) de los 70 pacientes de la muestra total, todos los pacientes analizados, tanto los identificados como *KRAS wild-type* (37) como *KRAS* mutado (33) se encontraban en el grupo mayor de 40 años.



**Figura 21.** Estado de la mutación *KRAS* distribuido según la localización del tumor primario

En cuanto a la distribución según el estadio tumoral (TNM), no se observaron diferencias significativas entre los grupos *wild-type* y mutado cuando se agrupaba a los pacientes en estadio precoz (0-IIa) y localmente avanzado (IIb-IIIc). De un total de 45 pacientes en estadio precoz, 23 (51,1%) y 22 (48.9%) pertenecían al grupo *wild-type* y mutado, respectivamente. De los 3 pacientes en estadio avanzado (IV) solo 1 (33,3%) pertenecía al grupo *wild-type* (Tabla 19).

## RESULTADOS

Tabla 19. Comparación de los aspectos clínicos y anatomopatológicos según el estado mutacional de *KRAS*

Características		Número de pacientes	Estado de <i>KRAS</i>	
			<i>Wild-type</i>	Mutado
<b>Pacientes</b>		70	37 (52,3%)	33 (47,7%)
<b>Sexo</b>	Mujeres	29	13 (44,8%)	16 (55,2%)
	Hombres	41	24 (58,5%)	17 (41,5%)
<b>Edad</b>	Menor de 40	0	0	0
	Mayor de 40	70	37	33
<b>Tamaño tumoral (cm)</b>			4,0	4,3
<b>Tipo Histológico</b>	Adenocarcinoma	66	36	30
	Mucinoso	4	1	3
<b>Grado de Diferenciación</b>	G1	5	1	4
	G2	62	33	29
	G3	2	2	0
	G4	1	1	0
<b>Afectación ganglionar</b>			12	7
<b>Invasión</b>	Perineural		4	7
	Linfovascular		6	5
<b>Estadio TNM</b>	0	2	0	2
	I	21	10	11
	IIA	22	13	9
	IIB	2	1	1
	IIC	1	0	1
	IIIA	1	1	0
	IIIB	13	7	6
	IIIC	5	3	2
	IV	3	2	1

### 2.1.1.2. Tipos de mutaciones de *KRAS*.

El sitio más prevalente de mutación fue el exón 2 (n=24, 72,7%), seguido por el exón 3 (n=5, 15,2%) y el exón 4 (n=4, 12,1%). De las mutaciones en el exón 2, la mayoría se detectaron en el codon 12 (n=18, 54,5%) si se compara con las mutaciones en el codon 13 (n=6, 18,2%), mayoritariamente de localización izquierda. Las mutaciones en el codon 12 fueron mayoritarias en todos los grupos de localización tumoral (36,4%, 66,7%, 57,1% en localización derecha, izquierda y recto, respectivamente).

La mutación puntual más frecuente en el codon 12 fue G12D (n= 10, 55,5%), de los cuales 5 fueron en tumores localizados en colon izquierdo, 2 en colon derecho y 3 en recto, seguido de la mutación G12V (n=5, 27,8%). La mutación puntual menos frecuente en el codon 12 fue G12R. Dentro de las mutaciones en el codon 12 localizadas en colon izquierdo la mutación *KRAS*<sup>G12V</sup> fue detectada en igual número que la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup>. La mayoría de las mutaciones de *KRAS* detectadas en colon izquierdo y recto se presentaron en el codon 12 (n=10 y n=4 respectivamente), mientras que en colon derecho las mutaciones de *KRAS* mayoritarias se evidenciaron en conjunto en el codon 13, codon 146, codon 59 y codon 61.

En la Figura 22 se muestra la prevalencia en número de casos de las mutaciones obtenidas mediante la técnica de pirosecuenciación en el exón 2 (codon 12 y 13)

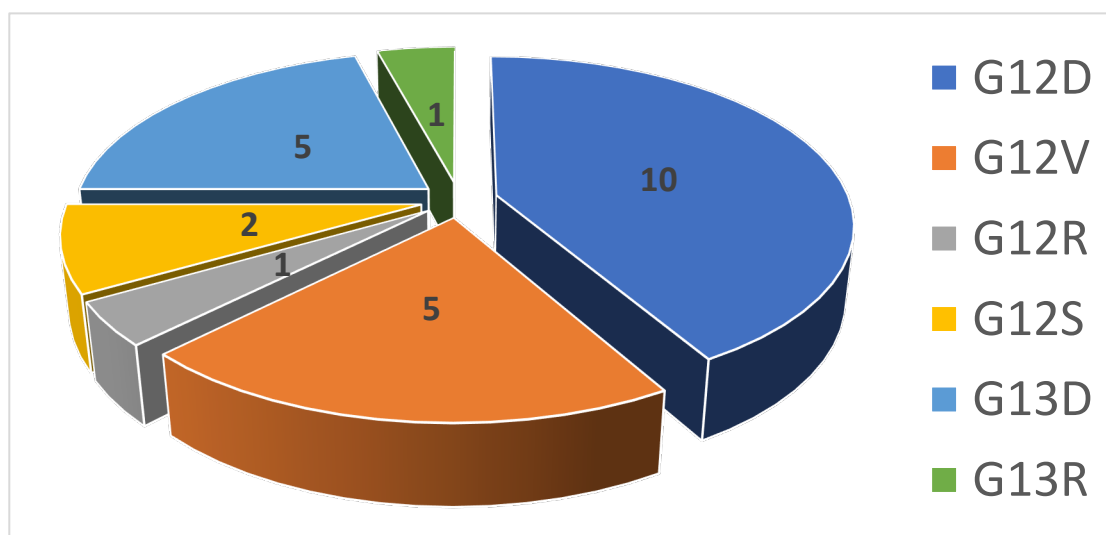


Figura 22. Distribución de las mutaciones de *KRAS* en el codon 12 y 13



RESULTADOS

Tabla 20. Tipos de mutaciones del gen *KRAS* detectados mediante pirosecuenciación

Mutaciones de <i>KRAS</i>													
EXON 2							EXON 4			EXON 3			
C. 12							C. 13			C. 59			
G12D	G12V	G12R	G12S	G12R	G12S	G12S	G13D	G13R	A146V	A146T	A59T	Q61R	Q61H
33 (45,71%)							5 (15,2%)						
24 (72,7%)							4 (12,1%)						
18 (54,5%)							4 (12,1%)						
TOTAL	10	5	1	2	5	1	6 (18,2%)	1	2	2	1	1	2
Colon derecho	2	0	1	1	2	1	2	1	1	1	0	1	1
Colon izquierdo	5	5	0	0	2	2	2	0	1	1	1	0	0
Recto	3	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
CARACTERÍSTICAS													
Colon derecho	4 (36,4%)						3 (27,2%)			2 (18,2%)		0 (0%)	
Colon izquierdo	10 (66,7%)						2 (13,3%)			2 (13,3%)		1 (6,7%)	
Recto	4 (57,1%)						1 (14,3%)			0 (0%)		0	
Mujeres	7						4			1		0	
Hombres	11						2			3		1	
ILV	2						1			0		1	
IPN	3						2			1		1	
ADC invasivo	16						6			4		1	
ADC mucinoso	2						0			0		0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
I	6	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
II	2	1	1	1	3	1	3	1	0	1	0	0	0
III	2	3	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1
IV	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
G2	8	5	1	2	5	1	5	1	1	0	1	0	2
G3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

IVL: invasión linfovascular, IPN: invasión perineural, ADC: adenocarcinoma, G: grado de diferenciación

### 2.1.1.3. Supervivencia según estado mutacional

Según como se muestra en la Tabla 21 no hubo diferencias significativas en las muestras con el estado *KRAS wild-type* frente al mutado en cuanto a SLE (24 vs 23,8 respectivamente;  $p=0,9$ ) y SG (24,1 vs 25,4 respectivamente;  $p=0,5$ ). El seguimiento en todas las muestras estudiadas fue de al menos 35 meses tras la cirugía radical.

Tabla 21. Supervivencia en meses según estado mutacional

	Estado	Número	Media (meses) +/- DS	<i>p</i>
SLE	<i>Wildtype</i>	37	24+/- 9,1	0,9
	Mutado	33	23,8 +/- 7,9	
SG	<i>Wildtype</i>	37	24,1 +/- 8,9	0,5
	Mutado	33	25,4 +/- 7,0	

SLE: supervivencia libre de enfermedad; SG: supervivencia global; DS: desviación estándar

En la Figura 23 se muestran las diferencias en SLE y SG entre los grupos *KRAS wild-type* y mutado, se puede observar que ambos grupos mantienen una línea estable en SLE hasta los 15 meses de seguimiento, disminuyendo en el grupo mutado en el transcurso del seguimiento. En cuanto a SG, se observa un descenso en los primeros meses de seguimiento en el grupo *wild-type*, pero a partir de los 25 meses ambas líneas se equiparán.

## RESULTADOS

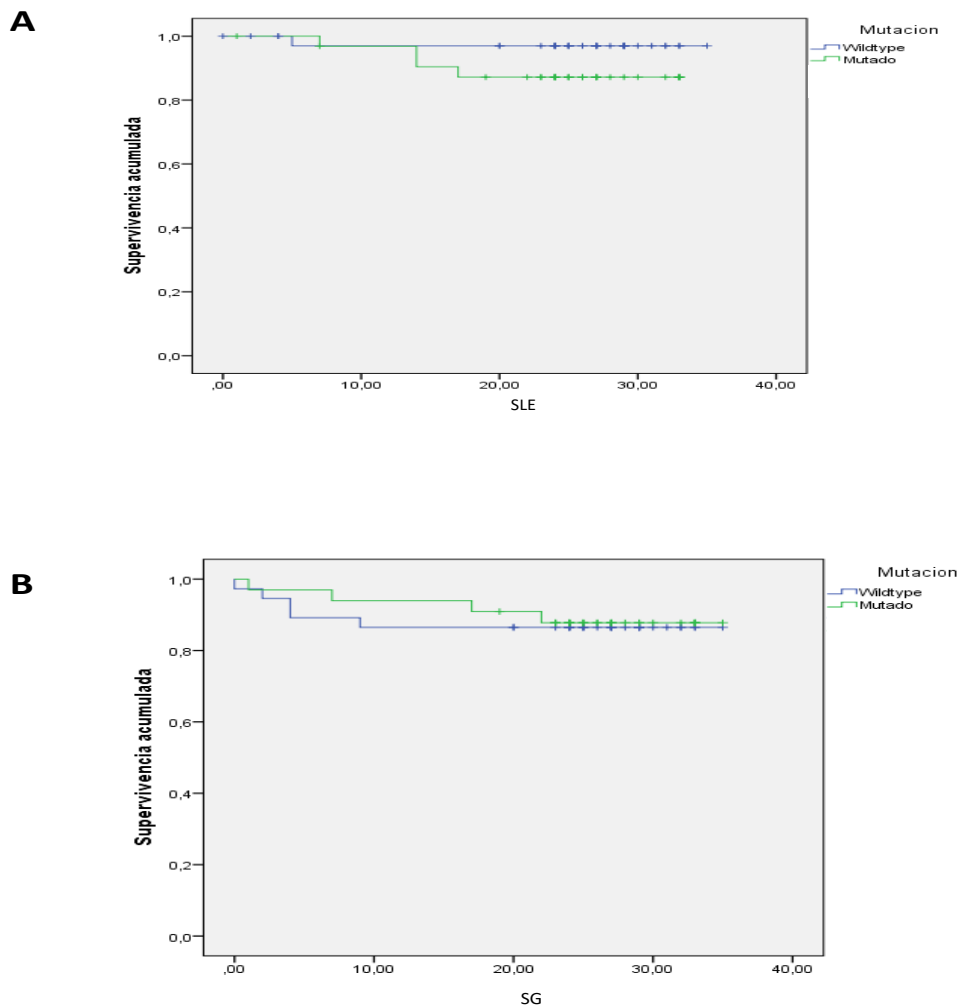


Figura 23. Gráficas comparativas entre estado *wild-type* y mutado en cuanto a SLE (A) y SG (B).

### 2.1.2. Análisis mediante ddPCR

#### 2.1.2.1. Muestras analizadas y representaciones gráficas

De las 70 muestras de ADN extraídas del tejido tumoral FFPE, se analizaron mediante ddPCR las muestras en las que se detectó la mutación  $KRAS^{G12D}$  mediante pirosecuenciación (N=10). Por otra parte, se seleccionaron en total 5 muestras como grupo control, cuatro muestras con tumores  $KRAS$  *wild-type* en el exón 2 y una muestra (ID 67) con la mutación  $KRAS^{Q61L}$  (exón 3).

El análisis de los resultados de la ddPCR se realizó con el programa informático Quantasoft v.1.7 (Bio-Rad), que permite exportar los datos gráficamente en dos formas. En los gráficos 1D se representa de manera individual la amplitud de la fluorescencia emitida en el canal 1, que detecta el fluoróforo FAM con el que está marcada la sonda que hibrida con la secuencia que presenta la mutación, y en el canal 2, que detecta el fluoróforo HEX con el que está marcada la sonda que hibrida con la secuencia nativa o *wild-type*.

En los gráficos 2D ambos canales se representan enfrentados en dos ejes, observándose cuatro poblaciones de gotas o *droplets*. En el cuadrante inferior izquierdo en gris se muestran las gotas dobles negativas, en las que no ha habido amplificación de ADN; en azul las gotas positivas en FAM, portadoras de moléculas mutadas; en verde las gotas positivas en HEX, portadoras de moléculas nativas o *wild-type*; y en naranja las gotas dobles positivas en las que ha habido amplificación de ambos tipos de moléculas.

Otros gráficos obtenidos con este programa informático incluyen la representación del número de gotas positivas por réplica cuantificadas en cada canal así como en el “merged” o mezcla de todas las réplicas de una misma muestra, la concentración en copias por microlitro de reacción de moléculas nativas y mutadas, y la abundancia en porcentaje (“*fractional abundance*”), que procede de dividir la concentración en copias por microlitro de ADN mutado entre el ADN total (la suma de esta concentración más la concentración de ADN *wild-type*).

### 2.1.2.2. Tejido tumoral *wild-type* y/o no $KRAS^{G12D}$

Se detectó un número residual de copias  $KRAS^{G12D}$  en los tumores *wild-type*. Debido al nivel de fondo inespecífico, se consideró como umbral de positividad la media de copias/ng de ADN de las muestras controles + 2 veces la desviación estándar (DS) cuyo resultado fue 0,41 copias/ng de ADN. Los resultados se muestran en el Tabla 22.

## RESULTADOS

Tabla 22. Resultados en tejido tumoral FFPE mediante ddPCR en el grupo control

G12D					WT		
	ID	Copias/ $\mu$ L	Copias/20 $\mu$ L reacción	Copias/ng ADN	Copias/ $\mu$ L	Copias/20 $\mu$ L reacción	Copias/ng ADN
WT	56	0,12	2,40	0,05	508	10160,00	203,20
	63	0,4	8,00	0,16	805	16100,00	322,00
	67	0,48	9,60	0,19	518	10360,00	207,20
	71	0,67	13,40	0,27	1019,00	20380,00	407,60
	96	0,80	16,00	0,32	525,00	10500,00	210,00

WT: *wild-type*

En el canal 1 del grafico 1D se muestra algún evento de fondo específico mientras que el en el canal 2 se muestran claramente una cantidad considerable de eventos positivos de secuencia *KRAS* nativa o *wild-type* (Figura 24).

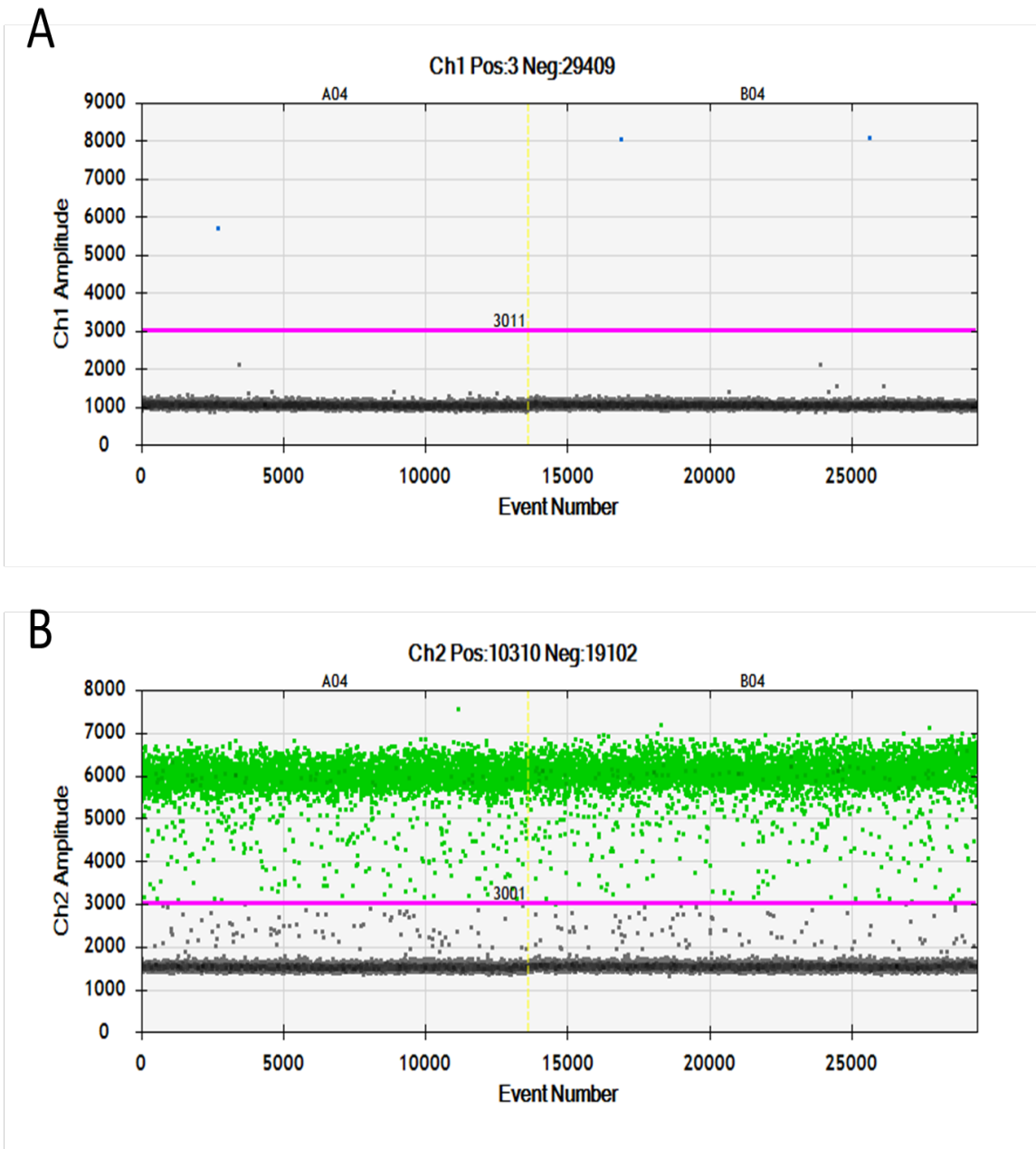


Figura 24. Gráficos de amplitud 1D de la muestra FFPE-56, control *wild-type*. A: canal 1: eventos positivos de fondo (azul). B: canal 2: eventos positivos de secuencia *KRAS* nativa o *wild-type* (verde)

Igualmente, en el grafico 2D se muestra en el cuadrante inferior derecho los múltiples eventos positivos de *KRAS wild-type*, mientras que en el cuadrante superior izquierdo se observan solo tres eventos positivos para la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> que no superan el umbral de positividad establecido (Figura 25).

## RESULTADOS

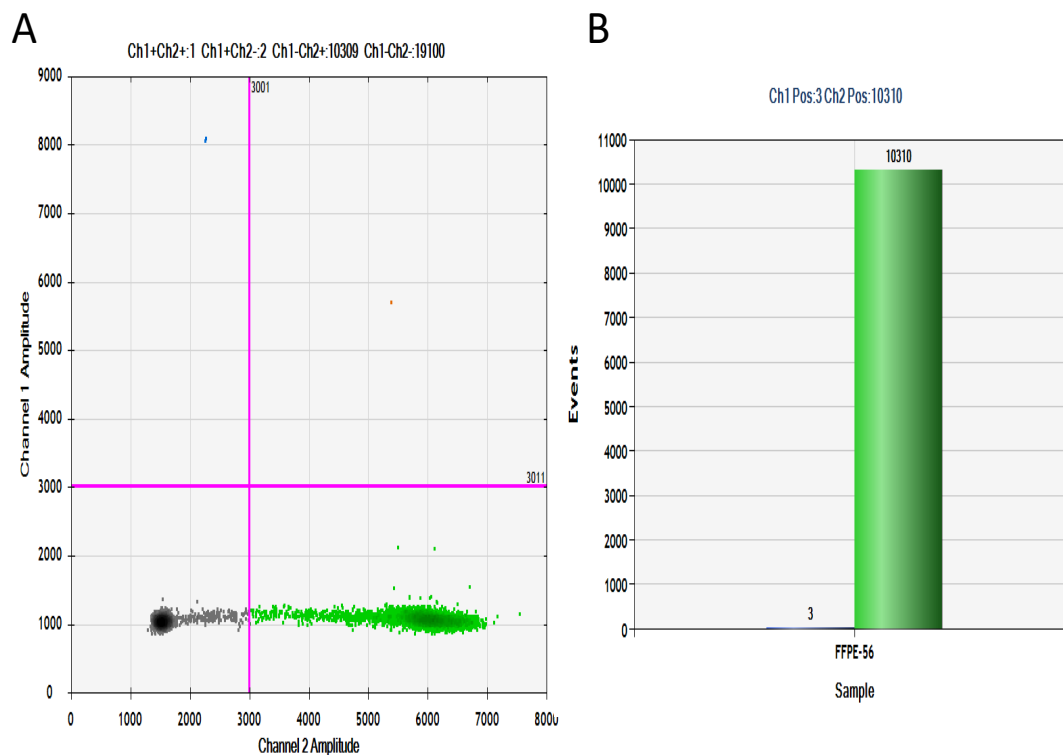


Figura 25. A. Gráfico de amplitud 2D de la muestra FFPE-56, control *wild-type*. B. Gráfico que representa todas las réplicas realizadas de la muestra FFPE-56, control *wild-type*. Los eventos positivos en FAM (azul) corresponden a gotas que contienen moléculas de DNA portadoras de la mutación y en HEX (verde) gotas que contienen moléculas con la secuencia nativa o *wild-type*.

### 2.1.2.3. Tejido tumoral *KRAS*<sup>G12D</sup>

Al correlacionar ambas técnicas, se logró confirmar en todos los casos la detección de la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> mediante ddPCR en el ADN de tejido tumoral FFPE. Todas las muestras de ADN con tumores G12D positivos estaban por encima del umbral de positividad establecido, mostrando una mediana significativamente mayor de copias mutantes/ng de ADN que en las muestras con tumores *KRAS* *wild-type* (106 y 0,19 copias/ng de ADN, respectivamente,  $p=0,001$ ). Sin embargo, la diferencia entre las medianas de copias *wild-type*/ng de ADN entre los dos grupos no fue estadísticamente significativa (210,00 vs 208,40 copias/ng de ADN,  $p=0.699$ ) (Tabla 23).

Tabla 23. Resultados en tejido tumoral FFPE mediante ddPCR en el grupo G12D positivos

	G12D				WT		
	ID	Copias/ $\mu$ L	Copias/20 $\mu$ L reacción	Copias/ng ADN	Copias/ $\mu$ L	Copias/20 $\mu$ L reacción	Copias/ng ADN
<b>G12D</b>	<b>17</b>	543,00	10860,00	<b>217,20</b>	521,00	10420,00	<b>208,40</b>
	<b>29</b>	555,00	11100,00	<b>222,00</b>	841,00	16820,00	<b>336,40</b>
	<b>30</b>	317,00	6340,00	<b>126,80</b>	474,00	9480,00	<b>189,60</b>
	<b>43</b>	188,00	3760,00	<b>75,20</b>	1301,00	26020,00	<b>520,40</b>
	<b>46</b>	457,00	9140,00	<b>182,80</b>	496,00	9920,00	<b>198,40</b>
	<b>51</b>	265,00	5300,00	<b>106,00</b>	893,00	17860,00	<b>357,20</b>
	<b>64</b>	75,80	1516,00	<b>30,32</b>	953,00	19060,00	<b>381,20</b>
	<b>70</b>	87,10	1742,00	<b>34,84</b>	262,00	5240,00	<b>104,80</b>
	<b>75</b>	167,00	3340,00	<b>66,80</b>	454,00	9080,00	<b>181,60</b>

En el canal 1 de la gráfica 1D se observan numerosos eventos positivos con distintas intensidades de fluorescencia correspondiente a la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> y en el canal 2 se observa una intensa “lluvia” de eventos con intensidades de fluorescencia intermedias entre la población de gotas positivas y la de gotas negativas correspondientes a moléculas *KRAS wild-type* (Figura 26).

En la gráfica 2D se muestra en el cuadrante inferior derecho una cantidad considerable de eventos positivos para *KRAS wild-type*, mientras que en el cuadrante superior izquierdo se observan una gran intensidad de eventos positivos para la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> superando largamente el umbral de positividad establecido (Figura 27).



# RESULTADOS

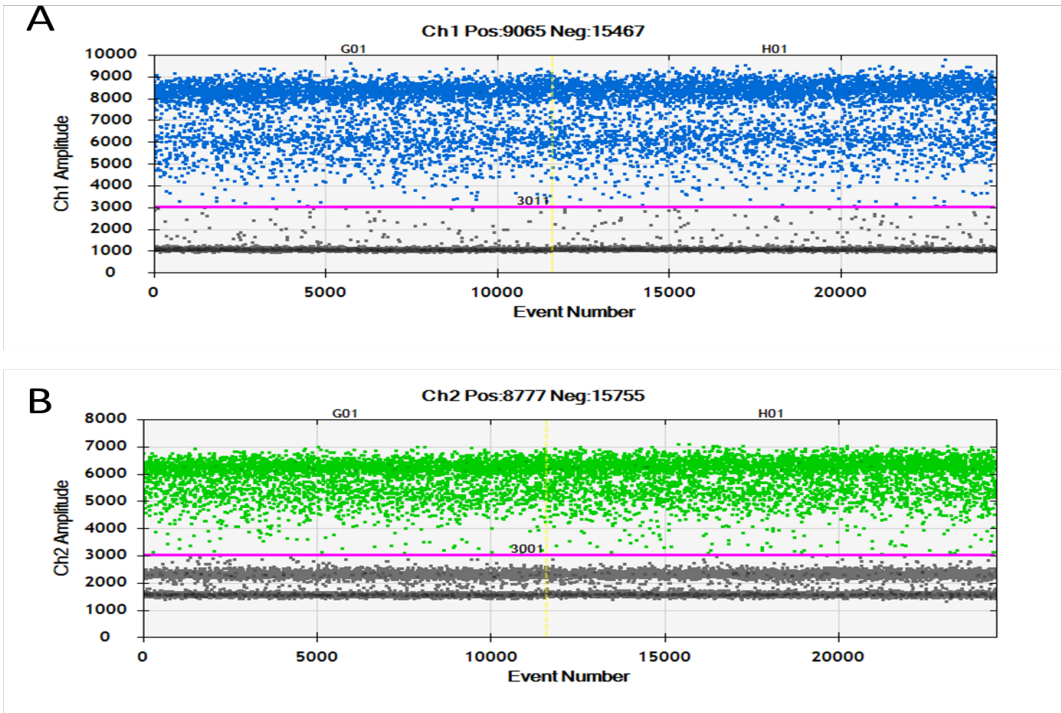


Figura 26. Gráficos de amplitud 1D de la muestra FFPE-17, positiva para  $KRAS^{G12D}$ . A: el canal 1: eventos positivos para la mutación  $KRAS^{G12D}$  (azul). B: canal 2: eventos positivos para  $KRAS$  wild-type (verde).

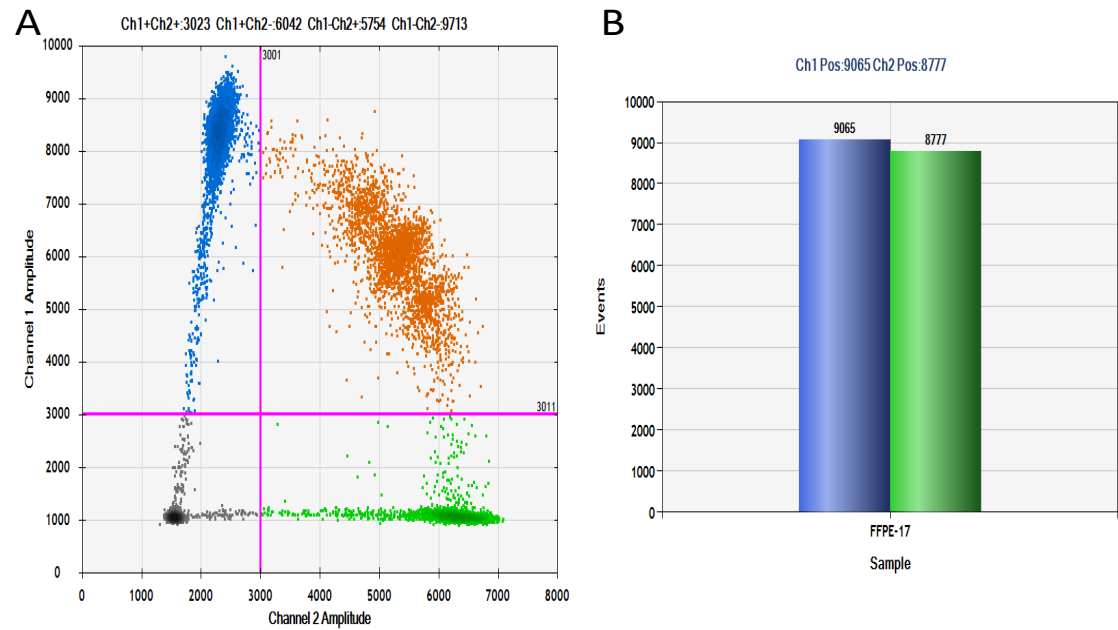


Figura 27. A. Gráfico de amplitud 2D de la muestra FFPE-17, positiva para  $KRAS^{G12D}$ . B. Gráfico que representa todas las replicas realizadas de la muestra FFPE-17, positiva para  $KRAS^{G12D}$ .

## RESULTADOS

En la Figura 28 se muestra la comparación del número de eventos en la mezcla (“merged”) de todas las réplicas realizadas en una muestra del grupo control (FFPE-56) y en una muestra G12D positivo (FFPE-17).

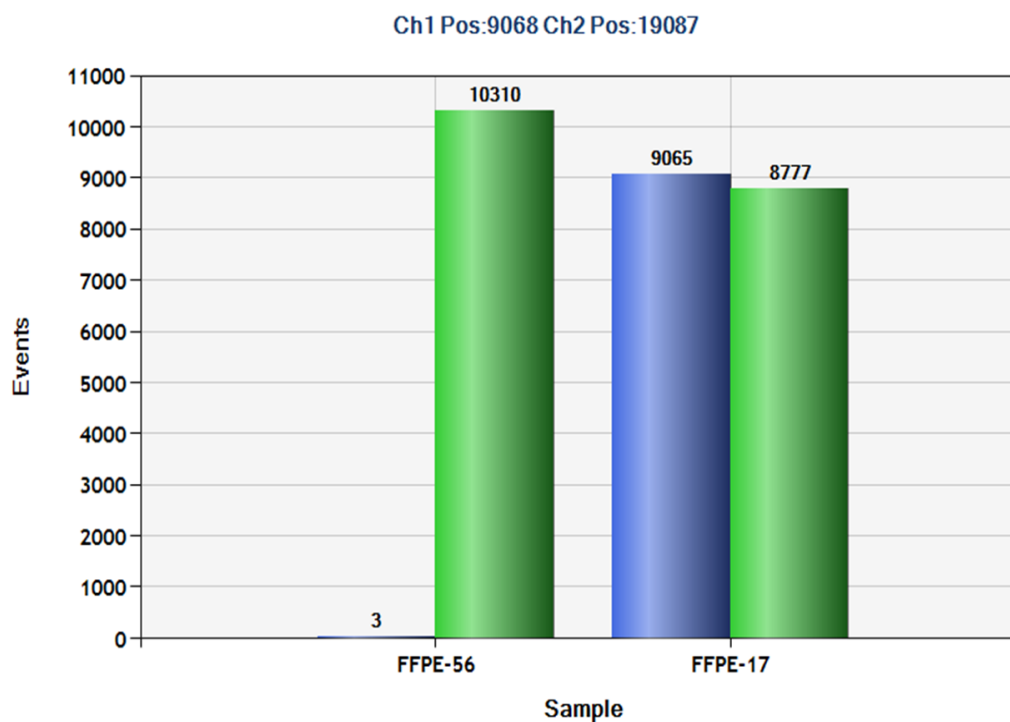


Figura 28. Gráfico comparativo del número de eventos positivos de réplicas entre la muestra control *wild-type* FFPE-56 y la muestra positiva para *KRAS*<sup>G12D</sup> FFPE-17.

En la Figura 29 se muestra un gráfico comparativo de la concentración de copias por microlitro de la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> y de *KRAS wild type* entre una muestra del grupo control FFPE-56 (0,12 vs 543 copias/μl, respectivamente) y una muestra G12D positivo FFPE-17 (508 vs 521 copias/μl, respectivamente). Aunque se observa una concentración de *KRAS wild-type* similar en ambas muestras, en el caso de FFPE-17 se observa más copias de *KRAS*<sup>G12D</sup> en comparación con la secuencia *wild-type*. Por otro lado, en la Figura 30 se realiza una comparación de la abundancia relativa (%) de ADN con la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> respecto a *wild-type* de ambas muestras (0,024% vs 51%, respectivamente).

RESULTADOS

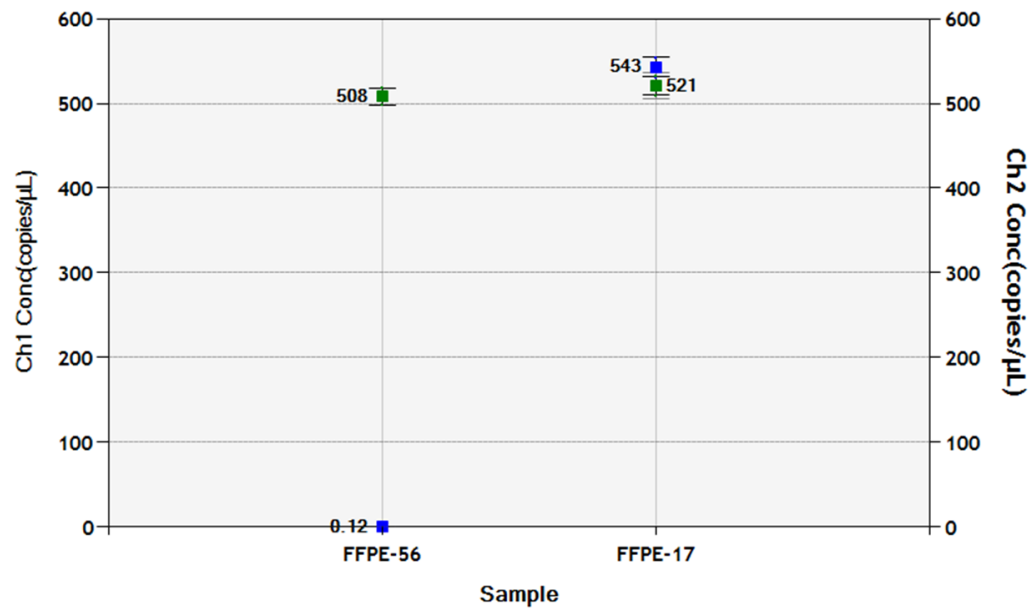


Figura 29. Gráfico comparativo de la concentración en copias por microlitro de *KRAS*<sup>G12D</sup> (azul) y *KRAS* nativo (verde) entre la muestra control *wild-type* FFPE-56, y la muestra positiva para *KRAS*<sup>G12D</sup> FFPE-17.

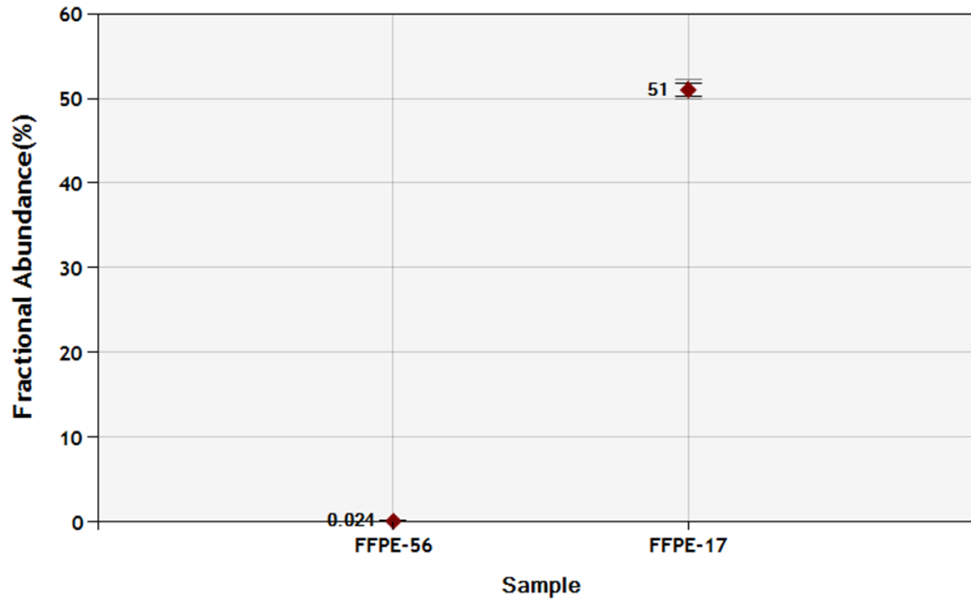


Figura 30. Gráfico comparativo de la abundancia (%) de ADN mutado con respecto del total en la mezcla de ambas réplicas de la muestra FFPE-56, control *wild-type*, frente a la muestra FFPE-17, positiva para *KRAS*<sup>G12D</sup>.

## 2.2. Análisis de la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> en muestras fecales

### 2.2.1. Obtención de ADN

De las 70 muestras fecales recolectadas en nuestra población de estudio previa a la cirugía, se logró obtener una concentración y pureza adecuada de ADN para su estudio en la totalidad de los casos. En la Tabla 24 se describe el peso de muestra fecal utilizado para la extracción de ADN y la cantidad de ADN en ng/μl obtenido en cada muestra de un total de 15 pacientes seleccionados, 10 con la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> y 5 *KRAS* *wild-type* confirmadas mediante pirosecuenciación.

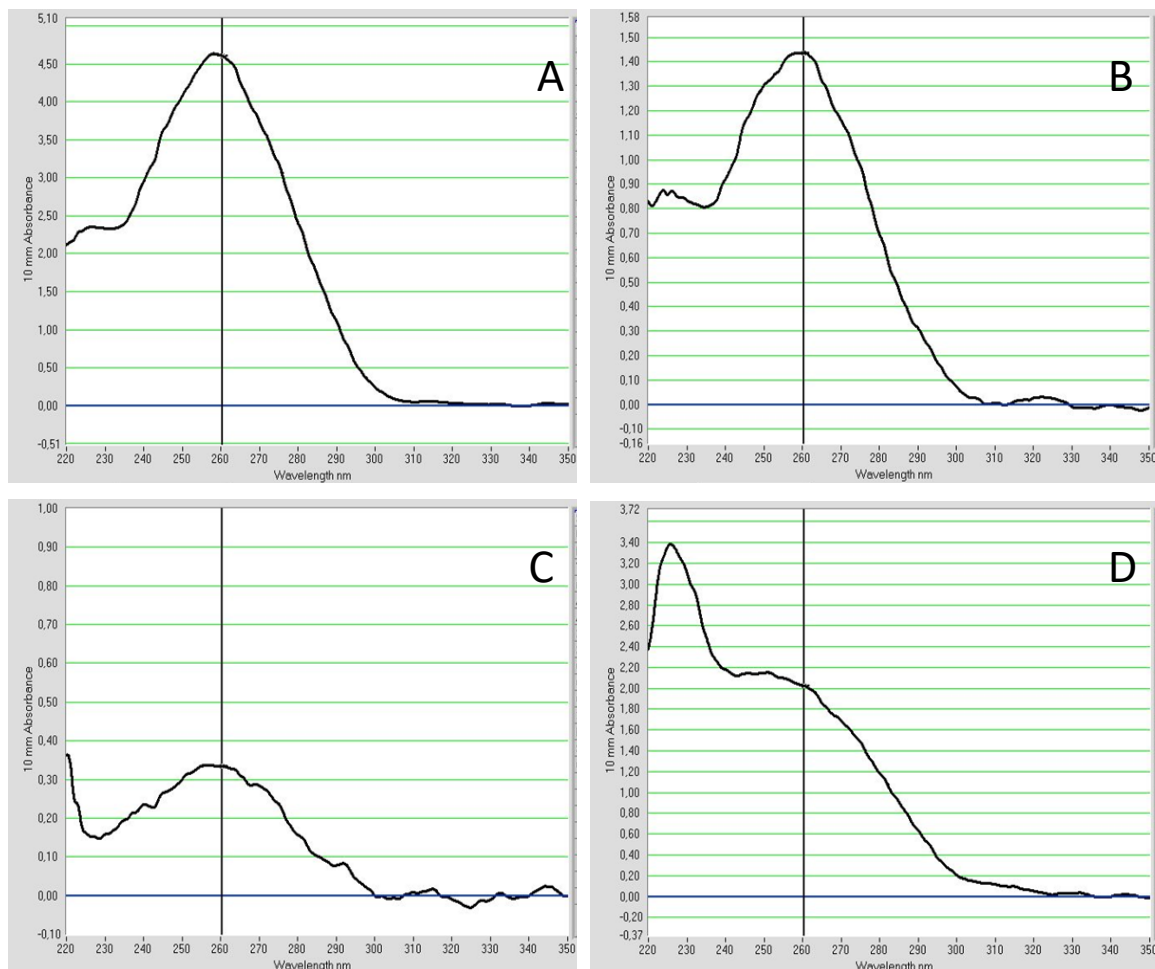
Tabla 24. Resultados de la obtención de ADN en muestras fecales

	Peso (mg)	ADN (ng/μL)	260/280	260/230
<b>MB-53</b>	486	165,38	1,82	1,30
<b>MB-56</b>	540	191,48	1,90	1,07
<b>MB-63</b>	619	230,86	1,92	1,98
<b>MB-71</b>	525	220,68	1,90	0,99
<b>MB-96</b>	523	148,45	1,76	0,47
<b>MB-12</b>	364	71,81	2,06	1,72
<b>MB-17</b>	559	18,16	1,95	1,77
<b>MB-29</b>	227	123,13	1,81	0,87
<b>MB-30</b>	490	254,00	1,91	1,45
<b>MB-43</b>	236	169,53	1,92	0,73
<b>MB-46</b>	232	62,96	1,76	0,48
<b>MB-51</b>	545	23,27	1,79	0,85
<b>MB-64</b>	499	101,36	1,71	0,65
<b>MB-70</b>	220	127,69	1,91	1,52
<b>MB-75</b>	282	103,79	1,89	0,80

En la gráfica de espectro de absorbancia del ADN obtenido de las muestra fecales, se observó un pico a 260 nm propio del ADN en concentración suficiente para su análisis y una pureza adecuada según la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm.

## RESULTADOS

En la Figura 31 se muestran cuatro ejemplos de los espectros obtenidos: en la muestra MB-63 y MB-12 con la mutación  $KRAS^{G12D}$  y  $KRAS$  *wild-type* respectivamente, se observa el pico de absorbancia a 260 nm. Por otro lado, en la muestra MB-17 con la mutación  $KRAS^{G12D}$  presenta un pico a 260 nm, pero más bajo en comparación con los anteriores, ya que la concentración de ADN de esta muestra fue menor. Sin embargo, en la muestra MB-64 con la mutación  $KRAS^{G12D}$  destaca la presencia de un pico de absorbancia a 230 nm que podría indicar que la pureza de esta muestra estaría disminuida, a pesar de que la concentración sea adecuada.



**Figura 31.** Espectro de absorbancia del ADN obtenido a partir de muestras fecales. A: muestra control, procedente de un paciente con  $KRAS$  nativo o *wild-type* (MB-63). B: muestra de un paciente con  $KRAS^{G12D}$  (MB-12). C: muestra de un paciente con  $KRAS^{G12D}$  (MB-17) con baja concentración de ADN. D: muestra de un paciente con  $KRAS^{G12D}$  (MB-64) en el que destaca la presencia de un pico de absorbancia a 230 nm.

### 2.2.2. Mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> en muestras fecales por ddPCR

Una vez obtenido el ADN de las muestras fecales, se analizó la presencia de la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> mediante ddPCR en las 10 muestras cuyos correspondientes tejidos tumorales fueron positivos para esta mutación mediante la técnica de pirosecuenciación. El ADN de 5 muestras fecales procedentes de pacientes con tumores *KRAS* *wild-type* en el exón 2 fueron incluidos como controles.

#### 2.2.2.1. Muestras fecales control *KRAS* *wild-type*

Se detectó un número limitado de eventos positivos para *KRAS*<sup>G12D</sup> en el ADN en las muestras controles (con la secuencia nativa o *wild-type*). Tal y como se consideró en la muestra de tejido tumoral FFPE, el umbral de positividad se calculó con la media de las copias/20 µL de reacción de las muestras controles + 2 veces la DS, correspondiente a un valor de 1,9 copias/20 µL. Se requirió entonces, que las muestras de ADN de muestras fecales tuvieran más de 1,9 copias/20 µL de reacción para ser consideradas positivas para la mutación (Tabla 25).

Tabla 25. Resultados en muestras fecales mediante ddPCR en el grupo control

	ID	Sitio	Estadio	Eventos positivos	G12D			WT	
					Copias/ 20 µL reacción	Copias/ ng ADN	Eventos positivos	Copias/ 20 µL reacción	Copias/ ng ADN
WT	53	I	I	3	1,40	0,011	469	210,00	1,615
	56	I	IIA	1	0,40	0,003	76	31,20	0,240
	63	D	IIA	1	0,42	0,003	957	406,00	3,123

RESULTADOS

	71	D	IIIB	3	1,20	0,009	377	144,00	1,108
	96	I	IV	3	1,20	0,009	133	56,80	0,437

WT: *wild-type*, I: *izquierdo*, D: *derecho*

En el gráfico de amplitud 2D, se observa en el cuadrante superior derecho tan solo un evento positivo mutado en una muestra control *wild-type* (MB-63) que se considera una señal de fondo inespecífico. Se realizó varias replicas en esta misma muestra confirmandose el resultado *wild-type* mediante ddPCR (Figura 32).

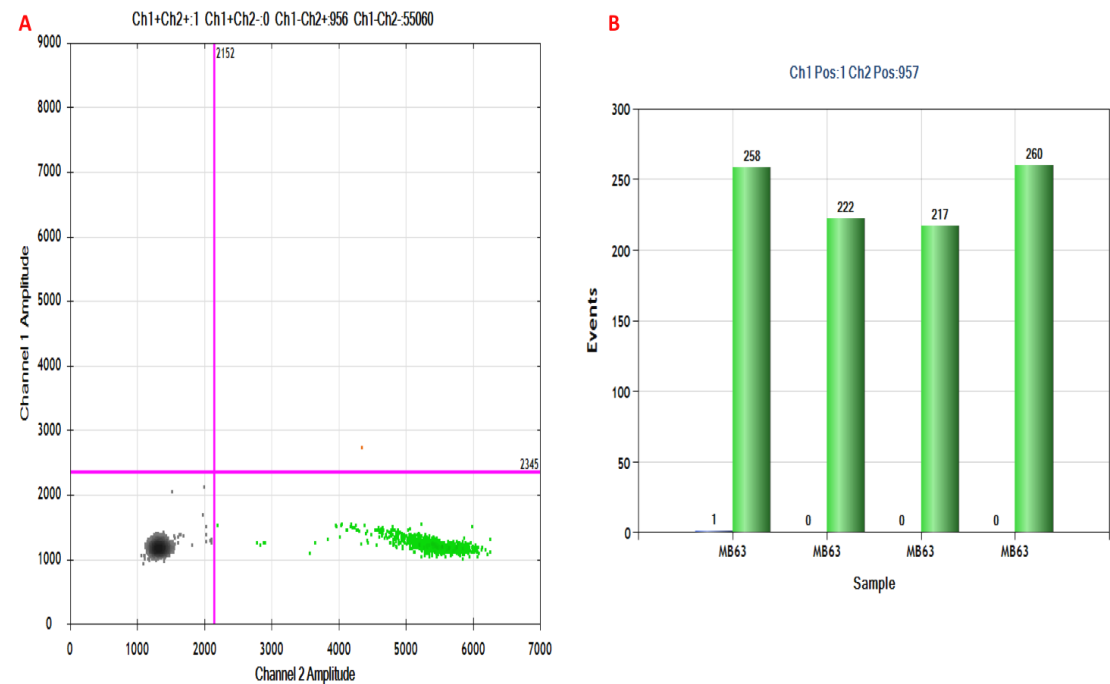


Figura 32. A. Gráfico de amplitud 2D de la muestra control *wild-type* MB-63. Se observa un evento positivo mutado residual que se considera señal de fondo. B. Gráfico que representa todas las réplicas realizadas de la muestra MB-63.

2.2.2.2. Muestras fecales *KRAS*<sup>G12D</sup>

De acuerdo con el concepto de umbral de positividad, que fue equivalente a un número superior a 3 eventos positivos en cada muestra, se detectó la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> en 8 de las 10 muestras G12D positivas por ddPCR. De estas 8 muestras positivas, 6 presentaban tumores en un estadio precoz de la enfermedad. Las muestras MB-64 y MB-46 se consideraron negativas debido a que presentaban valores inferiores o iguales al umbral de positividad (Tabla 24).

Tabla 26. Resultados en muestras fecales mediante ddPCR en el grupo G12D positivos

	G12D							WT	
	ID	Sitio	Estadio tumoral	Eventos positivos	Copias/ 20 µL reacción	Copias/ ng ADN	Eventos positivos	Copias/ 20 µL reacción	Copias/ ng ADN
G12D	12	R	I	14	7,40	0,051	493	262,00	1,819
	17	I	I	4849	1944,00	41,362	19664	9120,00	194,043
	29	I	IIIB	11	6,00	0,024	257	142,00	0,577
	30	D	I	18	10,80	0,017	757	462,00	0,728
	43	D	IIIC	19	11,80	0,035	1393	882,00	2,602
	46	I	IIC	3	1,80	0,014	265	156,00	1,238
	51	R	I	47	18,00	0,295	5110	2052,00	33,639



RESULTADOS

	64	I	I	0	0,00	0,000	653	244,00	1,877
	70	I	I	45	27,40	0,036	8516	5880,00	7,656
	75	I	IIA	11	6,60	0,032	964	580,00	2,788

WT: *wild-type*

Las medianas de copias *KRAS*<sup>G12D</sup>/20 µL de reacción y de copias/ng de ADN en muestras fecales del grupo control difirieron significativamente del grupo con tumores G12D positivos ( $p=0,017$ ). La secuencia *KRAS* *wild-type* se detectó en muestras fecales de todos los pacientes del grupo control, aunque no hubo diferencias significativas en la mediana del número de copias *KRAS* *wild-type*/ng de ADN fecales entre ambos grupos ( $p = 0,129$ ).

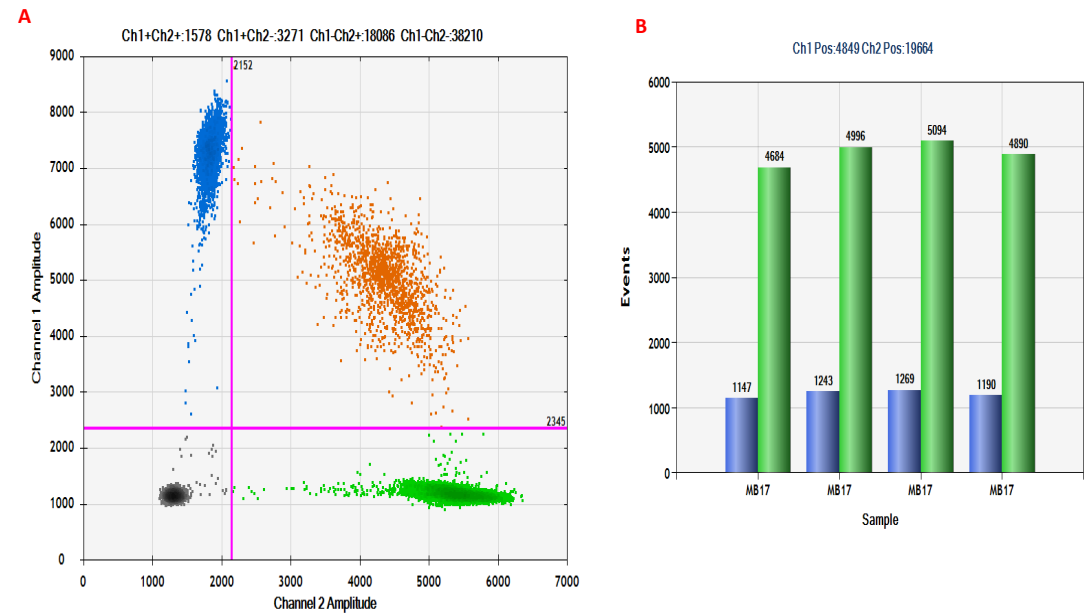
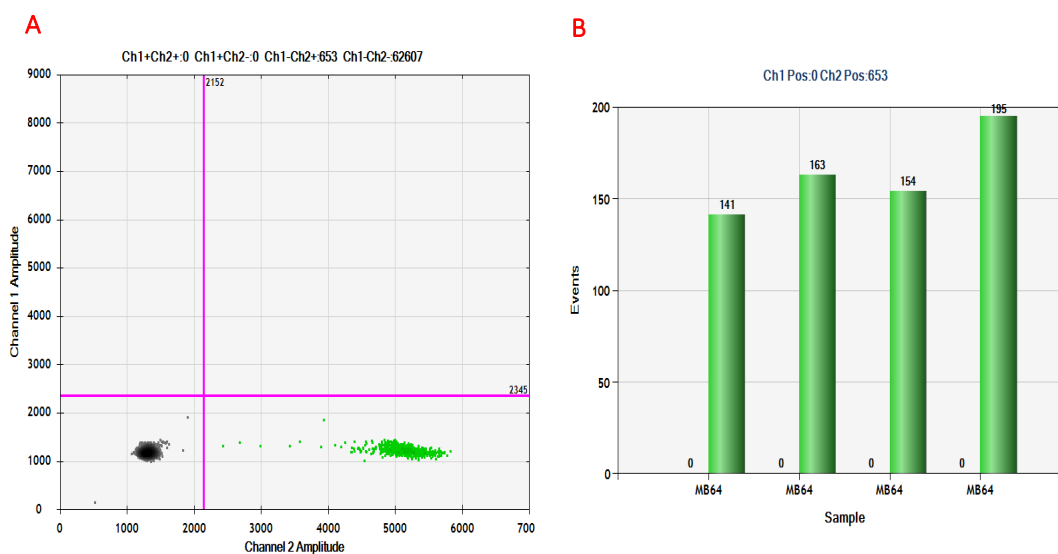


Figura 33. A. Gráfico de amplitud 2D de la muestra positiva para *KRAS*<sup>G12D</sup> MB-17. B. Gráfico que representa todas las replicas realizadas de la muestra MB-17, positiva para *KRAS*<sup>G12D</sup>.

## RESULTADOS

En la Figura 34 se muestran los resultados en amplitud 2D y en número de eventos positivos de las cuatro réplicas realizadas en la muestra MB-64, negativa para *KRAS*<sup>G12D</sup>.



**Figura 34. A. Gráfico de amplitud 2D de la muestra negativa para *KRAS*<sup>G12D</sup> MB-64. B. Gráfico que representa todas las replicas realizadas de la muestra MB-64, negativa para *KRAS*<sup>G12D</sup>.**

En resumen, los resultados de la pirosecuenciación mostraron una concordancia del 100% con el análisis mediante ddPCR de los tejidos FFPE, mientras que la ddPCR detectó la mutación de *KRAS*<sup>G12D</sup> en 8 de las 10 muestras fecales estudiadas. En la Figura 33 se detallan los resultados en amplitud 2D y en número de eventos positivos de las cuatro réplicas realizadas en la muestra *KRAS*<sup>G12D</sup> positiva MB-17 por ddPCR.

En la Figura 35 se muestra un gráfico comparativo de la concentración en copias/μl de la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> y de *KRAS* *wild type* entre una muestra del grupo control *wild-type* MB-63 (0,021 vs 20,3 copias/μl, respectivamente), una muestra G12D positivo MB-17 (97,2 vs 456 copias/μl, respectivamente) y una muestra G12D positivo MB-64 (0 vs 12,2 copias/μl, respectivamente). Se observa una concentración mayor de *KRAS* *wild-type* en la muestra MB-17 en comparación con las otras dos muestras. Por otro lado, en la Figura 36 se realiza un comparación de la abundancia relativa (%) de ADN con la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> respecto al *wild-type* en las tres muestras mencionadas (0,1% vs 17,56% vs 0% respectivamente).

RESULTADOS

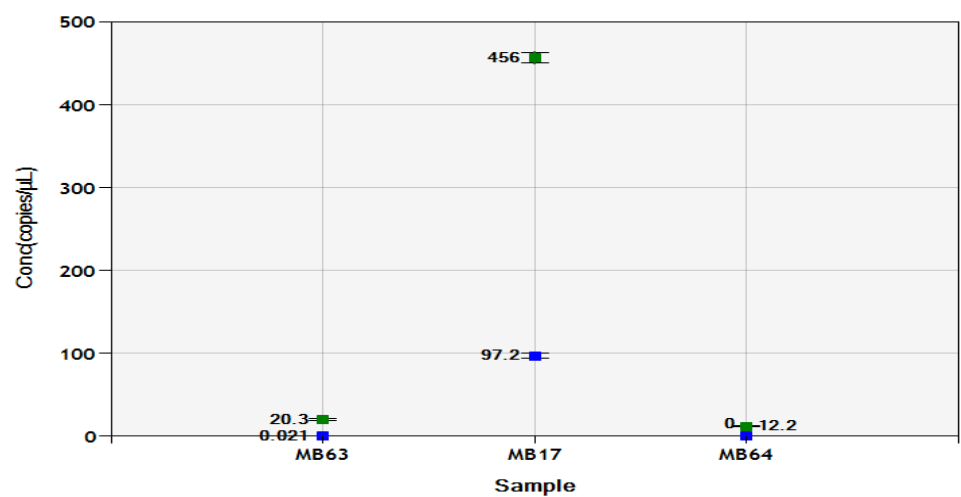


Figura 35. Gráfico comparativo de la concentración en copias por microlitro de *KRAS*<sup>G12D</sup> (azul) y *KRAS* nativo (verde) entre la muestra control *wild-type* MB-63, la muestra positiva para *KRAS*<sup>G12D</sup> MB-17 y la muestra negativa para *KRAS*<sup>G12D</sup> MB-64.

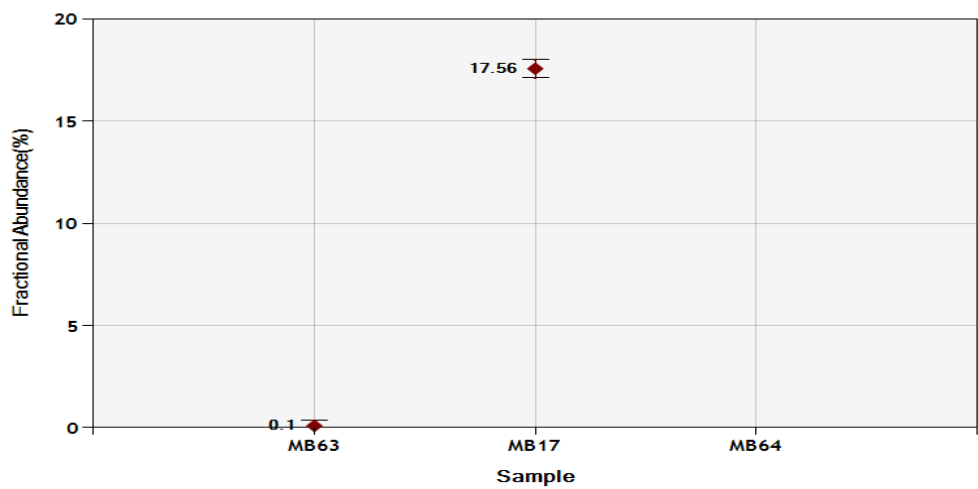


Figura 36. Gráfico comparativo de la abundancia (%) de ADN mutado con respecto del total en la mezcla de réplicas de la muestra control *wild-type* MB-63, la muestra positiva para *KRAS*<sup>G12D</sup> MB-17 y la muestra negativa para *KRAS*<sup>G12D</sup> MB-64

## **DISCUSIÓN**

El CCR sigue siendo, a pesar de los avances científicos, una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Las pruebas de cribado, aunque han permitido realizar diagnósticos en etapas precoces de la enfermedad, parecen ser insuficientes en la reducción de su incidencia, sobre todo en pacientes jóvenes, en los cuales parece haber aumentado en los últimos años. En nuestra muestra de estudio los casos de CCR se han presentado en pacientes de edad avanzada, en los que la incidencia global continúa siendo mayoritaria.

### **1. Características del tumor primario**

Se han observado diferencias epidemiológicas e histológicas en los CCR proximales y distales: los pacientes con CCR del lado derecho tienen más probabilidades de presentarse en mujeres, de mayor edad e histología mucinosa, indiferenciada o en anillo de sello en comparación con tumores de lado izquierdo(373, 374). Nuestra muestra presenta un mayor número de pacientes varones, siendo la histología predominante el adenocarcinoma convencional. La localización del tumor primario se podría utilizar como un sustituto de la biología subyacente, debido a las diferentes vías de carcinogénesis y características moleculares variables(375). Con la disponibilidad de plataformas genómicas capaces de examinar ampliamente la expresión y la metilación génica, como lo demuestra el Atlas del Genoma del Cáncer, ahora podemos identificar los subtipos genómicos del CCR que también se distinguen entre tumores proximales y distales(376). Una definición firme del punto de división entre los CCR del lado derecho e izquierdo no se usa uniformemente. La distinción más común, la cual utilizamos en nuestro estudio, define los cánceres proximales hasta la reflexión esplénica y los cánceres distales desde la flexión esplénica hasta el rectosigma(377), los tumores de recto definidos desde el rectosigma hasta la línea pectínea fueron subdivididos para considerar la exclusión de los pacientes que recibieron neoadyuvancia. Este punto de corte se utiliza debido a que la mayor parte (dos tercios proximales) del colon transversal surge embriológicamente del intestino medio, y solo el tercio distal surge del intestino posterior. Aunque el intestino medio también da origen a otros órganos, como la mayor parte del intestino delgado y el apéndice vermiforme, los carcinomas que surgen en estos órganos tienen biología única con diferentes tasas de mutaciones y se tratan clínicamente de forma especial(378), y por lo tanto no han sido incluidos en la mayoría de los estudios previos de CCR.

## DISCUSIÓN

El suministro vascular también se ha propuesto como una característica definida del origen embriológico y de su localización: las arterias mesentéricas superior e inferior irrigan al intestino medio e intestino posterior, respectivamente. Aunque por motivos prácticos, debido al origen embrionario mixto del colon transversal, algunos estudios excluyen el colon transversal de los análisis que dicotomizan los CCR izquierdo y derecho(379), nuestro grupo de estudio no descartó dichos tumores para no disminuir el número total de muestras. La localización rectal a menudo también se excluye(380) porque la mayoría de los casos se diagnostica en estadios IIb-III, donde es necesario un tratamiento neoadyuvante sistémico y/o radioterápico, lo que podría afectar a algunos de nuestros objetivos, como la obtención de ADN viable para su estudio. Por otro lado, biológicamente, la variación del número de copias somáticas y los análisis de expresión de ARNm y microARN en los tumores malignos de colon y de recto son indistinguibles, por lo que consideramos necesario tomar muestras fecales de pacientes con carcinomas rectales sin tratamiento previo, donde nuestra fuente de estudio, el ADN humano, no fuera alterado.

Como se ha señalado anteriormente, existen distintos orígenes embriológicos de la localización derecha e izquierda del colon. Estos distintos orígenes y los procesos de migración y diferenciación celular requeridos durante el desarrollo embriológico normal requieren distintos patrones de expresión genética dentro del intestino medio y el intestino posterior(381). Por lo tanto, los distintos fundamentos embriológicos del colon derecho e izquierdo probablemente contribuyen a las diferencias en la biología subyacente.

Existen diferentes perfiles de expresión genética entre el epitelio normal del colon derecho e izquierdo. El colon derecho normal tiene una mayor expresión de los genes de la familia del citocromo P450 que el colon izquierdo, lo que sugiere una diferente exposición a los metabolitos de las sustancias ingeridas(382). Del mismo modo, hay diferencias significativas en los patrones de metilación de genes entre el colon derecho e izquierdo. En particular, la prevalencia de la metilación del promotor del gen de reparación de errores de coincidencia hMLH1 y el O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) es significativamente mayor en la mucosa del colon derecho y especialmente en mujeres mayores(383), lo que podría sugerir que las aberraciones epigenéticas en la mucosa preneoplásica del colon derecho puedan reflejarse en la consecuente biología del adenocarcinoma del lado derecho. Por todo ello creímos importante dividir las muestras según la localización del tumor primario.

Reflejando los diferentes factores predisponentes, las lesiones premalignas que conducen al CCR varían sustancialmente entre el colon derecho e izquierdo. Los pólipos *serrados* sésiles son más frecuentes en el colon derecho. Por el contrario, los adenomas tubulares y tubulovelloso convencionales se distribuyen de manera más uniforme en todo el marco cólico, aunque es más probable que presenten una displasia de alto grado o focos de adenocarcinoma en el colon derecho(384). Estos adenomas tienen características moleculares distintas y suelen ser precursores de una variedad de CCR biológicamente distintos(385). En nuestro grupo, el diagnóstico de CCR se basó en su totalidad en estudios mediante colonoscopias y biopsias de tejido. Es importante mencionar que, debido a las diferentes características biológicas, físicas y técnicas, las colonoscopias y polipectomías realizadas se asocian con una disminución significativa en la incidencia del CCR del lado izquierdo en comparación con los CCR del lado derecho.

Se han identificado rutas alternativas de la carcinogénesis en el CCR que se encuentran correlacionadas de forma significativa con su localización en el trayecto colónico. Los CCR que presentan una hipermetilación en todo el genoma causante del silenciamiento del gen epigenético, denominado CIMP-*High* (CIMP-H), tienden a ser mutuamente excluyentes de los tumores de inestabilidad cromosómica, definidos por una marcada aneuploidía(386). Los CCR CIMP-H están particularmente enriquecidos en tumores MSI, en gran parte debido al silenciamiento epigenético del gen MMR de MLH1(387). Estos tumores CIMP-H/MSI-H tienen más probabilidades de aparecer en el lado derecho del colon(388), mientras que los tumores CIN tienen más probabilidades de presentarse en el lado izquierdo. Esto podría explicar en parte que la mayoría de los casos de mutación *KRAS* se presentara en tumores localizados y señalados como izquierdos en nuestro grupo sin incluir las mutaciones detectadas en carcinomas rectales.

CIMP y MSI son criterios pronósticos y, por lo tanto, contribuyen a las diferencias clínicas entre los CCR derechos e izquierdos. Los CIMP-H están asociados a una peor supervivencia(389), especialmente en el 50% de los cánceres CIMP-H/MSS(225). El impacto pronóstico de MSI depende del estadio. En los cánceres en estadio II y III, los tumores MSI-H tienen un pronóstico superior en comparación con los tumores MSS(390). Por el contrario, aunque solo el 4% de los CCR en estadio IV son MSI-H(391), estos tumores se han asociado históricamente con una supervivencia inferior. Este pronóstico precario, en comparación con el MSS, no se modifica en el subgrupo *BRAF* *wild-type*(205). Actualmente, debido a estudios emergentes donde se analiza la eficacia del sistema inmunitario y los anticuerpos de punto de control, como la muerte

## DISCUSIÓN

antiprogramada-1 (PD-1), en el tratamiento del CCR MSI-H(392), el pronóstico asociado a la enfermedad en estadio IV puede variar drásticamente. Sin embargo, dado la prevalencia de CIMP-H y MSI en los CCR del lado derecho y su impacto pronóstico conocido, estos factores podrían contribuir de forma significativa en los resultados oncológicos y de supervivencia según la localización del tumor.

Existen variaciones en las tasas de mutaciones en oncogenes y supresores tumorales entre los CCR de lado derecho e izquierdo. Por ejemplo, la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup>, la cual se asocia con una supervivencia significativamente inferior en el CCR estadio IV, es más predominante en los CCR del lado derecho(370). Por el contrario, las mutaciones *APC* y *TP53* predominan en los CCR izquierdos. Recientemente, se identificaron diferentes patrones de mutaciones *APC*, *TP53* y *KRAS* que confieren pronósticos variables(393), por lo que se justifica el análisis adicional describiendo el sitio primario del tumor, derecho o izquierdo. Además de las mutaciones puntuales, las amplificaciones potencialmente dirigibles a los receptores de las tirosina quinasas, como ERBB2 y el EGFR, también son más comunes en los CCR del lado izquierdo. Estas variaciones subyacentes en la mutación y los patrones genómicos pueden explicar resultados variables de la terapia oncológica y ofrecer posibles nuevas terapias, donde la localización del tumor sería una consideración importante.

Varios estudios han identificado los subtipos de CCR mediante la agrupación de expresión de genes no supervisados, con varias características consistentes en todos los esquemas de subtipo, como el subtipo MSI-H/CIMP-H predominantemente en los CCR del lado derecho y de tipo mesenquimatoso con mal pronóstico. Sin embargo, hubo una falta de coherencia entre los otros subtipos delineados, y cada esquema de clasificación tuvo entre 3 y 6 subtipos diferentes identificados(394). Para unir estos esquemas dispares de subtipos, el Consorcio internacional de subtipos de CCR aplicó múltiples clasificaciones independientes en un conjunto unificado de 3962 muestras. Se determinó la asociación entre estos esquemas de clasificación dispares y surgieron 4 CMS. En particular, CMS1, que está compuesto predominantemente por CCR del lado derecho, tiene predominancia por tumores MSI-H, CIMP-H y *BRAF*. Si bien las características genóticas como el estado de mutación de *KRAS* y *BRAF* son predominantes en algunos subtipos (*BRAF* en CMS1; *KRAS* en CMS3), su presencia o ausencia no define específicamente ningún subgrupo, lo que demuestra el valor limitado del genotipado en la definición de una biología más amplia del CCR. De forma similar, existe una heterogeneidad entre los CCR del lado derecho, de modo que, aunque son predominantes



en los subtipos CMS1 y CMS3, el subtipo CMS 4 también está representado por tumores localizados en el lado derecho.

Los ligandos EGFR epirregulina (EREG) y la anfirregulina (AREG) se expresan variablemente entre los CCR del lado derecho e izquierdo. La alta expresión tumoral de EREG y AREG se asocia con mayores tasas de respuesta y mejores resultados a la terapia con anticuerpos anti-EGFR en pacientes con CCRm y genotipo *KRAS* y *NRAS* *wild-type* (395). Las expresiones de EREG y AREG son significativamente más altas en los CCR del lado izquierdo y se correlacionan inversamente con la metilación del promotor y el estado de CIMP-H.

Existe un pronóstico variable según el estadio entre los pacientes con CCR derecho e izquierdo. Los registros de tumores y las cohortes retrospectivas sugieren que los tumores del lado derecho tienen un mejor pronóstico en estadio II, pero un peor pronóstico de la enfermedad en estadio III, probablemente asociada con la mayor prevalencia de tumores MSI-H de colon derecho en estadio II(396). Además, los análisis de ensayos clínicos prospectivos de pacientes con CCR en estadio III que recibieron quimioterapia adyuvante también demostraron una supervivencia inferior (HR, 0,70; IC del 95%, 0,61–0,81)(360). En nuestro grupo de estudio un gran número de tumores se encontraban en estadio III, tanto de localización derecha e izquierda, lo cual genera la necesidad de detectar de forma sencilla las mutaciones de *KRAS* para determinar un pronóstico de respuesta a la terapia anti-EGFR.

Los pacientes con CCRm con un tumor primario del lado derecho también tienen un peor pronóstico en comparación con casos de tumores primarios localizados en el lado izquierdo. Esto se explica mediante un análisis conjunto de 3 estudios de 2027 pacientes tratados con quimioterapia de primera línea, en los que aquellos con CCR del lado izquierdo tuvieron una mayor SG y SLE en comparación con aquellos con tumores localizados en el lado derecho, incluso después de ajustar la mutación *BRAF* y la histología mucinosa tumoral(397).

Queda entonces establecido que la localización primaria del CCR es un factor pronóstico, pero no es predictivo, por ejemplo, en el resultado oncológico de la terapia basada en bevacizumab. Un análisis de 2 ensayos prospectivos aleatorizados controlados de quimioterapia con o sin bevacizumab encontró, mediante una prueba de interacción estadística, que la asociación entre la localización del tumor y el uso de bevacizumab no fue significativa, lo que indica que la localización no es un biomarcador predictivo a favor o en contra del beneficio del bevacizumab. Sin embargo, la localización del CCR es tanto

## DISCUSIÓN

un factor pronóstico como predictivo del beneficio de la terapia anti-EGFR en pacientes con CCRm y refractario con genotipo *KRAS wild-type*. En un ensayo aleatorizado entre pacientes con CCR y genotipo *KRAS wild-type* en el codon 12/13, se evidenció una mejoría significativa en la SLE con cetuximab en tumores primarios de lado izquierdo (HR, 0.28; IC del 95%, 0.18–0.45 ), mientras que no hubo diferencias entre aquellos con tumores primarios del lado derecho (HR, 0.73; IC 95%, 0.42–1.27;  $p = 0.002$ )(380). Estudios retrospectivos adicionales también mostraron que los pacientes con CCR del lado izquierdo tuvieron una mejor SLE con terapia anti-EGFR en comparación con aquellos con CCR de lado derecho, incluso entre pacientes con mutaciones *KRAS/BRAF wild-type*(398).

Se han encontrado resultados similares con cetuximab de primera línea combinado con quimioterapia entre pacientes con CCR *wild-type* en los exones del 2 al 4 en *KRAS* y *NRAS*. En el estudio CALGB/SWOG 80405 que asignó al azar a pacientes con CCRm de tipo *KRAS wild-type* para recibir quimioterapia de primera línea con cetuximab o bevacizumab, se sabía que 474 pacientes eran de tipo pan-*RAS wild-type*. En este estudio, un tumor primario de lado derecho se asoció con una SG inferior en el grupo con cetuximab (HR, 1.81 frente al lado izquierdo; IC del 95%, 1.27–2.56). La SLE también fue significativamente menor en pacientes con un tumor de localización derecha que recibieron cetuximab, pero no fue significativamente menor entre las que recibieron bevacizumab(399), lo que indicaba que la ubicación de lado derecho era un biomarcador predictivo de inferior supervivencia con quimio-inmunoterapia basada en cetuximab ( $p = 0.0009$ ). Estos resultados se corroboraron mediante un análisis de 394 pacientes con CCRm de tipo *RAS wild-type* aleatorizados para recibir FOLFIRI de primera línea con cetuximab o bevacizumab en el estudio FIRE-3. En este ensayo, nuevamente hubo una SG menor en tumores de lado derecho, entre los pacientes que recibieron cetuximab (mediana de la SG, 18.3 vs 38.3 meses;  $p < .001$ ), pero también entre los que recibieron bevacizumab (mediana de la SG, 23.0 vs 28.0 meses;  $p = 0.04$ )(400).

Datos adicionales que incluyen líneas de terapia por localización de tumor también pueden proporcionar información sobre las razones de la variabilidad en supervivencia observada en estos ensayos. Dada la marcada inferioridad de la SG observada entre los pacientes con CCR de lado derecho tratados con terapia anti-EGFR de primera línea, ha surgido el consenso de que en estos pacientes no deben recibir quimio-inmunoterapia basada en anti-EGFR de primera línea.

Los CCR del lado derecho e izquierdo tienen características biológicas subyacentes marcadamente diferentes, con una prevalencia para los cánceres mutantes MSI-H, CIMP-H y *BRAF* entre los CCR de lado derecho. Estas características se incluyen principalmente entre el subtipo genómico CMS1, que también se enriquece entre los CCR de lado derecho, aunque CMS3 también se inclina hacia los CCR de lado derecho. La distribución diferencial de estos subtipos de CCR genómicos y otras características biológicas entre los CCR del lado derecho e izquierdo puede contribuir a mejorar en el pronóstico inferior de los CCR del lado derecho en estadio avanzado y un resultado inferior con la terapia anti-EGFR. Los ensayos clínicos futuros en el CCR deberán considerar variables asociadas importantes y la localización del tumor primaria al desarrollar sus resultados, y es de esperar que permitan una terapia personalizada basada en los patrones biológicos subyacentes.

### 2. Evaluación coste-efectividad

Es importante tener en cuenta las evaluaciones económicas en pruebas de detección genéticas y detección de mutaciones específicas utilizadas en el CCR. El objetivo principal de estas evaluaciones es comparar las diferencias en los costos relacionados con los efectos en la calidad de salud entre las intervenciones alternativas para simplificar y respaldar el proceso de toma de decisiones. Varios autores, a través de estudios de casos, confirmaron la efectividad de la detección de mutaciones genéticas predictivas, lo que generó un aumento en su uso en la práctica clínica, con consecuencias importantes en términos de costos(401). Nuestro análisis también sugiere cómo la precisión de una prueba de diagnóstico, los costos y los supuestos realizados en la etapa inicial de la estimación del modelo influyen en los resultados de los estudios de evaluación económica(402). Si bien en nuestro estudio los costos fueron altos por los múltiples ensayos y pruebas a punto necesarios para asegurar unos resultados con validez externa e interna, creemos que al asegurar su utilidad en la práctica clínica por su importancia como prueba de cribado y factor predictivo y al desarrollar un protocolo adecuado los costos podrían disminuir.

En cuanto al diagnóstico en dos estudios publicados se concluye que las pruebas genéticas universales fueron rentables en comparación con los criterios de riesgo clínico. Sin embargo, algunos autores coinciden en que los criterios de Bethesda siguen siendo útiles para la detección de pacientes con CCR hereditario, aún cuando su limitación como

## DISCUSIÓN

herramienta basada en la historia clínica y su sensibilidad relativamente baja suscitan serias preocupaciones sobre su efectividad(49, 403).

Con respecto al "tratamiento", el escenario parece un poco más complejo y esto surgió claramente en dos estudios(404, 405). Ambos analizaron la rentabilidad de la prueba de detección de mutaciones de *KRAS* y/o *BRAF*, obteniendo resultados diferentes en términos de costos incluidos en el modelo. Ambos modelos mostraron que, para el umbral de *wild-type* más bajo, la selección de mutaciones de *KRAS* y *BRAF* es el enfoque más rentable entre las alternativas. La prueba de *KRAS*, que utilizamos en nuestro estudio, representa la segunda mejor opción y, finalmente, para una mayor cantidad de *wild-type*, la administración de tratamientos con anti-EGFR a todos los pacientes podría representar la mejor alternativa en términos de beneficios clínicos. La última hipótesis sugiere que la escasez de recursos impone la adopción de enfoques de detección para contener las terapias relacionadas con los altos costos. Dos estudios investigaron la rentabilidad de detectar las mutaciones de *KRAS* antes de administrar inhibidores de EGFR(406, 407). A pesar de que siguieron un enfoque metodológico diferente, ambos estudios mostraron una efectividad en ahorro de costos asociados con la adopción de pruebas predictivas para seleccionar pacientes para las terapias anti-EGFR. Es de destacar que varios estudios recientes subrayaron la importancia de la evaluación de las mutaciones *NRAS* (además de *KRAS*) antes de comenzar un tratamiento con agentes anti-EGFR. En consecuencia, solo los pacientes con pan-*RAS wild-type* se beneficiarán del tratamiento. También analizamos la evidencia económica en las pruebas de detección de mutación dirigida. Desafortunadamente, solo existe un artículo que comparaba diferentes tipos de pruebas de mutación *KRAS*(408). Los resultados sugirieron que las pruebas de *KRAS* con el kit de PCR Therascreen *KRAS* RGQ (QIAGEN) fueron más costosas y efectivas que la pirosecuenciación. En general, la evidencia económica sobre pruebas de detección genéticas en el CCR sugirió que todas las intervenciones de evaluación ahorran costos para ciertos umbrales de *wild-type*. Sin embargo, la escasa evidencia en este campo, combinada con la cantidad de supuestos realizados para efectuar los modelos y la falta de transparencia y consistencia en los métodos utilizados para derivar los costos, nos lleva a un alto nivel de incertidumbre sobre los resultados de la relación costo-efectividad. Por esta razón, se requiere una investigación importante para evaluar la mejor combinación entre las pruebas de detección, el tipo de prueba de detección genética y la terapia dirigida. Por lo tanto, nuestro estudio podría ser de utilidad al sumarse como evidencia científica y al contribuir con una alternativa de estudio para mejorar la brecha de coste-efectividad.

### 3. Aplicación de la ddPCR

En algunos estudios se ha descrito que la fijación del tejido en formalina causa daños en el ADN, principalmente fragmentación y alteraciones en su estructura que afectan a la calidad y cantidad de ADN amplificable en las muestras. En presencia de formaldehído, las secuencias de nucleótidos que contienen pares de bases guanina-citosina pueden formar enlaces entre las cadenas de ADN y unión a aminoácidos (*crosslinking*). La interacción con el formaldehído también debilita los puentes de hidrógeno y favorece la desnaturalización del ADN. Estas alteraciones reducen la eficiencia de la amplificación en la ddPCR y conducen a la aparición de “lluvia”: gotas con una señal intermedia entre las poblaciones positivas y negativas(409, 410).

Los diferentes protocolos de extracción y procesamiento del ADN previo a la ddPCR también pueden afectar su cantidad y calidad(410). Entre las principales recomendaciones para tener en cuenta en futuros estudios está el procesamiento de las muestras fijadas en formalina en el menor tiempo posible y el pretratamiento de las muestras FFPE con uracil ADN glicosilasa (UDG), que digiere las citosinas deaminadas (C>T) reduciendo las señales de falso-positivo.

Por otro lado, se ha observado una gran variabilidad en el número de copias de *KRAS* *wide-type* entre las diferentes muestras. Algunos autores han descrito anteriormente que el Nanodrop puede sobreestimar la concentración de ADN(411), y esa sobreestimación puede suponer hasta 2 veces la concentración obtenida en la ddPCR, considerando por tanto que las medidas espectroscópicas no son suficientemente adecuadas para este fin(412). Además, en nuestro estudio, al tratarse de ADN extraído a partir de muestras fecales, la cantidad de ADN total presente en las muestras, estimada según la absorbancia a 260 nm de ADN de doble cadena, incluye tanto el ADN humano como bacteriano, por lo que no sabemos en qué proporción se encuentra exactamente cada uno de ellos.

### 4. Implicación clínica de las mutaciones de *KRAS*

El estudio molecular a través del ADN de fluidos corporales en individuos con riesgo intermedio y/o alto para el CCR aparece como una herramienta diagnóstica y una nueva estrategia para detectar biomarcadores cuya utilidad se establece en la predicción del resultado clínico oncológico(413). Tanto las mutaciones del gen *KRAS* y la activación de la vía RAS/RAF/MAPK se caracterizan por ser los primeros eventos en la carcinogénesis

## DISCUSIÓN

colorrectal. Recientemente, el análisis y la determinación de las mutaciones del oncogén *KRAS* han adquirido un importante papel pronóstico y predictivo en el CCR(414), ya que su presencia, descrita en aproximadamente el 30% de los casos, podría determinar la ausencia de respuesta a la terapia anti-EGFR y por consiguiente un peor resultado oncológico en la enfermedad metastásica. Sin embargo, los pacientes con *KRAS wild-type* pueden mostrar resistencia al tratamiento oncológico, debido a la presencia de alteraciones en las otras vías de señalización del EGFR o la discordancia entre el estado de mutación *KRAS* del tumor primario y sus respectivas metástasis, esto como consecuencia de la heterogeneidad del tumor o la presencia de subclones mutados desarrollados durante la terapia y que no fueron detectados por los métodos estándar.

Las mutaciones de *KRAS* más frecuentes se encuentran en el codon 12 y 13, representando el 14.1% y el 7.3% de todos los casos, respectivamente. Algunos estudios han documentado un peor pronóstico en pacientes en los que la mutación puntual en *KRAS* era G12D (415). En nuestra población de estudio y en concordancia con análisis externos previos, la incidencia de la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> fue del 14,3%.

Cada vez más evidencias destacan la relevancia de la heterogeneidad inter e intratumoral en el CCR. La evolución clonal de subgrupos de células tumorales en tumores primarios y/o lesiones metastásicas portadoras de mutaciones en genes clínicamente accionables, incluido el oncogén *KRAS*, podría dar lugar a una resistencia secundaria a agentes terapéuticos, como los anticuerpos monoclonales anti-EGFR incluidos el cetuximab y panitumumab y tener una gran influencia en la toma de decisiones clínicas.

Por lo tanto, podría ser necesario biopsias de tejido en serie a lo largo del seguimiento clínico y terapéutico del paciente para una detección temprana de progresión o recurrencia de la enfermedad. El ADN tumoral presente en muestras fecales proviene de la exfoliación de células tumorales de la mucosa intestinal hacia la luz y podría representar una fuente alternativa y no invasiva de material genético para el cribado de la mutación del oncogén *KRAS* en pacientes con CCR(416). La exfoliación de colonocitos a la luz del intestino grueso es un fenómeno natural continuo que parece exacerbarse en situaciones específicas como la inflamación y la presencia de lesiones tumorales donde el desprendimiento de colonocitos es más frecuente que en situaciones normales(417). El análisis de biomarcadores genéticos en muestras de heces tiene mayores ventajas si se compara con la SOH debido a que el ADN se vierte continuamente en la luz intestinal como consecuencia de la exfoliación de células cancerígenas, mientras que la hemorragia intestinal puede presentarse de forma variable en la evolución de la enfermedad(418). Por

lo tanto, el análisis del ADN en muestras fecales podría evitar la necesidad de biopsias múltiples de tejido. El estudio que desarrolló el análisis de ADN en muestras fecales incluyó 22 pacientes diagnosticados con CCR, 11 con adenomas y 28 sanos. Las muestras fecales de estos pacientes se sometieron a pruebas de detección de mutaciones de 15 mutaciones puntuales en varios genes, incluido *KRAS*. En este estudio, se obtuvo una cantidad de ADN adecuada en todas las muestras. El panel examinado mostró una sensibilidad del 91% para el CCR y del 82% para los adenomas, con una especificidad del 93%(418). En otro estudio multicéntrico de casos y controles, una prueba automatizada para el análisis de ADN de heces multidiaria permitió la detección de CCR con una sensibilidad del 98%, independientemente del tamaño o el estadio de la lesión. La sensibilidad para las lesiones precancerígenas fue proporcional al tamaño de la lesión (57% para las lesiones > 1 cm y 83% para las lesiones > 3 cm)(256). Posteriormente, un estudio prospectivo que incluyó 9989 pacientes en los que se comparó el análisis de heces con la prueba FIT, utilizando colonoscopia como patrón de referencia, mostró que el ADN fecal tenía una sensibilidad más alta para la detección de CCR (92% frente a 74 %), pólipos con displasia de alto grado (69% frente a 46%) y pólipos *serrados* sésiles (42% frente a 5%). Sin embargo, en pacientes con tumores precoces o con resultados negativos, la especificidad del ensayo basado en ADN (87-90%) fue menor que FIT (95-96%)(419). Estos resultados concuerdan con un estudio prospectivo casi simultáneo donde se analizaron pólipos *serrados* sésiles  $\geq 1$  cm con el mismo panel de marcadores múltiples en ADN de muestras fecales, mostrando que la metilación del gen *BMP3* y *NDRG4* podrían ser marcadores altamente discriminantes para la detección y vigilancia de pólipos colorrectales(420).

Estos estudios condujeron a la aprobación por la FDA de un sistema de análisis de ADN fecal (Cologuard) en 2014 para la detección del CCR, que incluye un ensayo inmunoquímico para hemoglobina humana (SOHi) y biomarcadores moleculares asociados al CCR como los marcadores de metilación (regiones promotoras del gen *BMP3* y *NFRG4*), mutaciones de *KRAS* y  $\beta$ -actina. La prueba se basa en la amplificación y detección mediante *Quantitative allele-specific real-time target and signal amplification* (QuARTS™). Sin embargo, este sistema todavía tiene una aplicación limitada en la práctica clínica debido a su costo elevado. Las dificultades técnicas de esta prueba también incluyen la necesidad de recolección de un gran volumen de muestras fecales y la alta tasa de falsos positivos, lo que implica más colonoscopias confirmatorias con el consiguiente coste adicional(250). Un estudio prospectivo y multicéntrico que

## DISCUSIÓN

incluyó a 9989 personas de riesgo medio comparó la validez diagnóstica para neoplasia colorrectal del Cologuard con la prueba de SOHi (punto de corte de 20 µg Hb/g de heces), realizando posteriormente colonoscopia en todos los participantes(255). La sensibilidad de Cologuard fue superior a la de la prueba de SOHi para detectar CCR (92,3 frente al 73,8 %,  $p = 0,002$ ), adenoma avanzado (42,4 frente al 23,8 %,  $p = 0,001$ ) y PS avanzados (42,4 frente al 5,1 %,  $p < 0,001$ ). Sin embargo, la tasa de falsos positivos fue superior con el análisis del ADN fecal (14 %) respecto a la prueba de SOHi (5,1 %), lo que conlleva la realización de un número considerable de colonoscopias innecesarias. Además, la tasa de fallo técnico de Cologuard fue superior a la de la prueba de SOHi (86,6 % frente al 94,9 %,  $p < 0,05$ ). Otro estudio de menor calidad realizado en Alaska obtuvo resultados similares(204). La detección de marcadores moleculares en el ADN fecal sigue siendo un duro reto debido a la influencia de factores biológicos y limitaciones técnicas. Se necesitan técnicas de detección extremadamente sensibles para lograr una tasa de detección óptima debido a la baja abundancia de ADN humano con respecto al ADN microbiano en la muestra original, la presencia minoritaria de ADN específico de tumor frente al ADN de tejido sano y a la presencia de inhibidores de PCR en las muestras fecales(421).

La tecnología ddPCR, que ha mejorado la sensibilidad en la detección de mutaciones de alelos minoritarios en bajas concentraciones de ADN obtenido a partir de fluidos biológicos, como plasma(422, 423) y orina(424, 425) se basa en reacciones de amplificación de diez mil hasta millones de gotas microscópicas en una escala de nanolitros, logrando la amplificación por PCR de las moléculas contenidas en cada gota. Utilizando la ddPCR se ha demostrado que los pacientes con CCRm y/o con menos del 1% de la fracción *KRAS* mutada pueden beneficiarse de la terapia anti-EGFR. En el campo de la Oncología, el análisis de fluidos biológicos está ganando un interés creciente como una herramienta no invasiva y predictiva de gran valor clínico para controlar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento haciendo innecesarias las biopsias en serie. Hipotéticamente, el ADN del tumor debe eliminarse al contenido fecal intestinal antes de llegar al torrente sanguíneo. Esto conllevaría a que las pruebas de ADN fecal sean más sensibles en el cribado del CCR, al poder detectarse precozmente comparado con el plasma u otros fluidos biológicos(250). La detección de mutaciones *KRAS* por ddPCR ya se ha descrito utilizando una variedad de plataformas ddPCR disponibles en el mercado, con resultados variables(423, 426-430). La mayoría de ellos



se han centrado en la detección de mutaciones de *KRAS* en plasma, incluida nuestra publicación sobre la detección de la mutación G12V en pacientes con CCR(431).

Con respecto al análisis de ADN fecal, hay varias publicaciones que informan los resultados de la detección de mutaciones usando sistemas análogos a la ddPCR(421, 432-436). En 2008, se utilizó una prueba digital denominada BEAMing para detectar mutaciones en muestras fecales y en el ADN plasmático de pacientes con CCR. El ADN extraído de muestras fecales de 25 pacientes con CCR se examinó antes de la cirugía. En 23 pacientes del total (92%) se logró detectar las mismas mutaciones presentes en el ADN de tejido tumoral, mientras que sólo se detectaron dichas mutaciones en el 50% de las muestras de ADN plasmático. Estos resultados destacan una superioridad en detección de mutaciones en el ADN de muestras fecales en comparación con las muestras sanguíneas. En el estudio de Deng y cols. se analizó un panel de 8 mutaciones dentro de tres genes (*APC*, *TP53* y *KRAS*) en muestras fecales de pacientes con CCR utilizando el *Target Enriched Multiplex PCR* (Tem-PCR®), una emulsión aceite-agua, un terminal dUTP marcado e incorporado en las sondas específicas de mutación y una matriz de hidrogel. La viabilidad del ensayo se evaluó utilizando muestras fecales de 10 pacientes con CCR, debido a que no se pudo obtener una cantidad óptima de ADN en 2 muestras, sólo se pudieron detectar mutaciones en el ADN de 8 muestras fecales. Además, no todas las muestras tenían sus correspondientes muestras de tejido tumoral, por lo que sólo se pudo confirmar la presencia de la mutación en el ADN de las 4 muestras de tejido tumoral disponibles(435). Este trabajo fue la continuación de una publicación previa realizada por el mismo grupo de estudio donde se utilizó la tecnología denominada MDHB (*Multiplexed Digital-PCR coupled with Hydrogel Bead-array*) para detectar los niveles de expresión relativa de cuatro genes relacionados con el CCR (*C-MYC*, *COX-2*, *MMP7* y *DPEPI*) en 8 muestras de tejido tumoral y 9 muestras de muestras fecales de pacientes con CCR(433).

De manera similar, Pekin y cols. describieron un sistema para una detección sensible y cuantitativa de las mutaciones del oncogen *KRAS* utilizando la tecnología ddPCR(434). Sin embargo, este método sólo pudo ser validado en el ADN genómico de algunas líneas celulares por lo que es necesario realizar análisis adicionales en la detección de mutaciones *KRAS* en muestras clínicas para confirmar la aplicabilidad de este enfoque. En 2015, se propuso un método tecnológico denominado MLPA-DABA (*multiplex ligation-dependent probe amplification–digital amplification coupled with hydrogel bead-array*) para el diagnóstico de CCR. En este método, se utilizaron sondas MLPA

## DISCUSIÓN

específicas libres de colorante y la tecnología PCR de emulsión digital (emPCR), permitiendo el análisis simultáneo de expresiones múltiples y mutaciones de genes en baja proporción en una plataforma de detección única. Seis genes (*β-ACTIN*, *C-MYC*, *HRAS*, *CD44v6*, *COX-2* y *NRAS*) y tres mutaciones puntuales en el gen *APC* se analizaron con éxito utilizando este método en muestras de fecales de pacientes con CCR demostrando su potencial en el diagnóstico temprano(436). Vale la pena mencionar que, aunque han pasado varios años desde que se publicaron los resultados, ninguno de estos sistemas ha continuado desarrollándose y se ha sometido a una validación clínica. Un nuevo enfoque que se ha aplicado recientemente para la detección de mutaciones en los genes conductores del CCR en el ADN de muestras fecales es la SNG basada en amplicones(417). Sin embargo, esta metodología también requiere una mayor validación en una cohorte de pacientes más grande antes de su implementación en la práctica clínica habitual.

En nuestro estudio, el ADN de muestras fecales de pacientes con CCR se obtuvo con éxito en todos los casos. La mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> se determinó por pirosecuenciación de tejido FFPE como patrón de referencia. Los resultados de la detección de mutaciones *KRAS*<sup>G12D</sup> en tejido tumoral FFPE mediante ddPCR concuerdan totalmente con el análisis de pirosecuenciación, como se esperaba, dado que se ha demostrado que la ddPCR alcanza una sensibilidad incluso más alta que el método de pirosecuenciación(437).

Una vez que la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> fue examinada en tejidos tumorales FFPE, también se analizó el ADN de muestras fecales de los mismos pacientes. Se pudo detectar la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> en 8 de 10 muestras de ADN de pacientes en los cuales se tenía el conocimiento previo de que presentaban la mutación mediante pirosecuenciación. Cabe señalar que las dos muestras negativas mostraron un pico de absorbancia a 230 nm de longitud de onda. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 230 nm para estimar la pureza de los extractos de ácido nucleico, ya que se ha utilizado como un indicador del nivel de inhibidores de PCR potenciales en muestras fecales(438). Estos autores sugieren que los valores de absorbancia superiores a 230 nm podrían atribuirse a la presencia de compuestos orgánicos o sales caotrópicas, así como a otras sustancias asociadas con la turbidez de las muestras. Por lo tanto, la sensibilidad de detección podría reducirse en gran medida por la presencia de inhibidores de PCR en la muestra. Un posible enfoque que se ha propuesto para disminuir la concentración de inhibidores de la PCR en la muestra consiste en realizar una dilución 1:10 o mayor de los ácidos nucleicos en bruto. Sin embargo, la dilución de la muestra podría reducir la probabilidad de detectar la

mutación, ya que la concentración de ADN también podría verse disminuida. De hecho, esta estrategia no mejoró nuestros resultados. Sin embargo, se detectaron alelos *wild-type* en todas las muestras, independientemente de la presencia de eventos mutados e inhibidores de la PCR. Esto podría ser presumiblemente debido a la abundancia significativamente mayor de moléculas *wild-type* con respecto a las mutadas. Se deben realizar más estudios en una cohorte de pacientes más grande para evitar falsos negativos. Como se describió previamente, estos estudios propondrían calcular un factor de dilución apropiado que permita reducir la concentración de inhibidores sin diluir el ADN objetivo por debajo del límite de detección.

Destaca la muestra ID del paciente 17 donde se observó una notable concentración de copias mutantes y tipo *wild-type*, esto debido presumiblemente a la preparación intestinal mediante enemas previo a la toma de muestra, cumpliendo con el protocolo prequirúrgico establecido en el centro. Nuestra hipótesis de este resultado es que la limpieza endoluminal podría haber aumentado la exfoliación de las células tumorales a la luz intestinal. En ese caso, esta observación plantea la cuestión de si la preparación intestinal previa a la toma de muestras podría ser o no aconsejable para aumentar la sensibilidad de la detección de las mutaciones de *KRAS* mediante ddPCR al aumentar la cantidad de ADN humano para su estudio.

Los recientes avances en biología molecular permiten realizar un diagnóstico temprano no invasivo de CCR mediante el análisis de las células exfoliadas en la luz intestinal en las muestras de heces de pacientes con CCR. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que evalúa la sensibilidad de la detección de la mutación *KRAS*<sup>G12D</sup> en el ADN de muestras fecales de pacientes con CCR utilizando esta plataforma de ddPCR. Sólo fue posible el análisis de la mutación de *KRAS* más prevalente (G12D) en nuestra población de estudio debido a que era la única con un número suficiente de muestras disponibles para su estudio (n = 10). Para mutaciones de menor incidencia, como G12V, el número de muestras parecía insuficiente para determinar resultados concluyentes.

Como principales limitaciones se puede plantear el reducido número de pacientes obtenidos con la mutación mayoritaria en el CCR, aunque el porcentaje de mutación *KRAS* fue el esperado en nuestro grupo de estudio. Se logró el análisis de 10 pacientes con la mutación G12D, lo que limita el valor interno y externo de nuestro estudio y el análisis estratificado de supervivencia en función del tipo de mutaciones *KRAS*. Todo ello podría justificarse por el elevado coste de los análisis de pirosecuenciación y ddPCR y la financiación limitada para este proyecto.

## DISCUSIÓN

Por otro lado, debido a que la oncogénesis del CCR, que involucra la interacción de múltiples genes, es un proceso de varias etapas, como la activación de protooncogenes y la inactivación de genes supresores, el método de detección de un solo gen podría a menudo diagnosticar la enfermedad de forma errónea; por lo tanto, la detección combinada de múltiples genes podría aumentar la capacidad diagnóstica de la enfermedad. Hoy en día, la tecnología de la ddPCR ofrece la posibilidad de detectar todas las mutaciones en los codones 12 y 13 de *KRAS* utilizando un ensayo multiplex comercial desarrollado recientemente por el fabricante (Bio-Rad). Un ensayo múltiplex que cubra simultáneamente todas las mutaciones de *KRAS* relevantes para la toma de decisiones de terapia anti-EGFR maximizaría los beneficios y optimizaría la relación costo-efectividad de este enfoque.

## **CONCLUSIONES**

El presente trabajo según los resultados obtenidos permite concluir:

1. En el 80% de los casos positivos para la mutación G12D del gen *KRAS* por pirosecuenciación en tejido tumoral FFPE, se detectó mediante ddPCR en el ADN fecal.
2. El método desarrollado en este estudio permite la obtención de ADN humano en concentración suficiente, a partir de muestras fecales de pacientes diagnosticados de CCR.
3. La mutación puntual con mayor incidencia en el gen *KRAS*, detectada en el ADN obtenido del tejido tumoral FFPE mediante pirosecuenciación fue G12D.
4. La detección de la mutación G12D del gen *KRAS* mediante ddPCR en el ADN obtenido a partir de muestras fecales y tejido tumoral FFPE, en pacientes con CCR, es factible, reproducible y equiparable con resultados obtenidos mediante la técnica de pirosecuenciación.
5. La mutación del gen *KRAS*, la cual se indentificó en su mayoría de los casos en tumores localizados en colon izquierdo, se asoció a una menor supervivencia libre de enfermedad en el seguimiento clínico postoperatorio en los pacientes estudiados.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(2):157-62.
2. Boveri T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci*. 2008;121 Suppl 1:1-84.
3. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-13.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
6. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, et al. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature*. 1982;300(5888):143-9.
7. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol*. 1998;16(9):3158-68.
8. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(1):7-30.
9. Edwards BK, Noone AM, Mariotto AB, Simard EP, Boscoe FP, Henley SJ, et al. Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer. *Cancer*. 2014;120(9):1290-314.
10. Murphy G, Devesa SS, Cross AJ, Inskip PD, McGlynn KA, Cook MB. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *Int J Cancer*. 2011;128(7):1668-75.
11. Murphy N, Strickler HD, Stanczyk FZ, Xue X, Wassertheil-Smoller S, Rohan TE, et al. A Prospective Evaluation of Endogenous Sex Hormone Levels and Colorectal Cancer Risk in Postmenopausal Women. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(10).
12. Gunter MJ, Hoover DR, Yu H, Wassertheil-Smoller S, Rohan TE, Manson JE, et al. Insulin, insulin-like growth factor-I, endogenous estradiol, and risk of colorectal cancer in postmenopausal women. *Cancer Res*. 2008;68(1):329-37.
13. Lin JH, Zhang SM, Rexrode KM, Manson JE, Chan AT, Wu K, et al. Association between sex hormones and colorectal cancer risk in men and women. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(4):419-24.e1.
14. Siegel RL, Jemal A, Ward EM. Increase in incidence of colorectal cancer among young men and women in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(6):1695-8.
15. Irby K, Anderson WF, Henson DE, Devesa SS. Emerging and widening colorectal carcinoma disparities between Blacks and Whites in the United States (1975-2002). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(4):792-7.
16. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, Schootman M, Lian M, Park Y, et al. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer*. 2012;118(14):3636-44.
17. Doubeni CA, Major JM, Laiyemo AO, Schootman M, Zauber AG, Hollenbeck AR, et al. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(18):1353-62.
18. Kelly JJ, Alberts SR, Sacco F, Lanier AP. Colorectal cancer in Alaska native people, 2005-2009. *Gastrointest Cancer Res*. 2012;5(5):149-54.
19. Perdue DG, Haverkamp D, Perkins C, Daley CM, Provost E. Geographic variation in colorectal cancer incidence and mortality, age of onset, and stage at diagnosis among American Indian and Alaska Native people, 1990-2009. *Am J Public Health*. 2014;104 Suppl 3:S404-14.
20. McMahon BJ, Bruce MG, Koch A, Goodman KJ, Tsukanov V, Mulvad G, et al. The diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection in Arctic regions with a high prevalence of infection: Expert Commentary. *Epidemiol Infect*. 2016;144(2):225-33.
21. Zumkeller N, Brenner H, Zwahlen M, Rothenbacher D. *Helicobacter pylori* infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Helicobacter*. 2006;11(2):75-80.
22. Yin D, Morris CR, Bates JH, German RR. Effect of misclassified underlying cause of death on survival estimates of colon and rectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(14):1130-3.



## BIBLIOGRAFÍA

23. Bach PB, Schrag D, Brawley OW, Galaznik A, Yakren S, Begg CB. Survival of blacks and whites after a cancer diagnosis. *JAMA*. 2002;287(16):2106-13.
24. Le H, Ziogas A, Lipkin SM, Zell JA. Effects of socioeconomic status and treatment disparities in colorectal cancer survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(8):1950-62.
25. Lai Y, Wang C, Civan JM, Palazzo JP, Ye Z, Hyslop T, et al. Effects of Cancer Stage and Treatment Differences on Racial Disparities in Survival From Colon Cancer: A United States Population-Based Study. *Gastroenterology*. 2016;150(5):1135-46.
26. Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, O'Rourke MA, Frontiera MS, Jackson DV, et al. Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *J Clin Oncol*. 2005;23(34):8671-8.
27. Jawed I, Wilkerson J, Prasad V, Duffy AG, Fojo T. Colorectal Cancer Survival Gains and Novel Treatment Regimens: A Systematic Review and Analysis. *JAMA Oncol*. 2015;1(6):787-95.
28. Murphy CC, Harlan LC, Lund JL, Lynch CF, Geiger AM. Patterns of Colorectal Cancer Care in the United States: 1990-2010. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(10).
29. Lynch D, Murphy A. The emerging role of immunotherapy in colorectal cancer. *Ann Transl Med*. 2016;4(16):305.
30. Sineshaw HM, Robbins AS, Jemal A. Disparities in survival improvement for metastatic colorectal cancer by race/ethnicity and age in the United States. *Cancer Causes Control*. 2014;25(4):419-23.
31. Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima-Hibiya Y, et al. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn J Cancer Res*. 2000;91(7):686-91.
32. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683-91.
33. Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Fedirko V, Norat T, et al. Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. *BMC Med*. 2014;12:168.
34. Patel SG, Ahnen DJ. Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012;14(5):428-38.
35. Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2006;42(2):216-27.
36. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(10):2992-3003.
37. Samadder NJ, Curtin K, Tuohy TM, Rowe KG, Mineau GP, Smith KR, et al. Increased risk of colorectal neoplasia among family members of patients with colorectal cancer: a population-based study in Utah. *Gastroenterology*. 2014;147(4):814-21.e5; quiz e15-6.
38. Tuohy TM, Rowe KG, Mineau GP, Pimentel R, Burt RW, Samadder NJ. Risk of colorectal cancer and adenomas in the families of patients with adenomas: a population-based study in Utah. *Cancer*. 2014;120(1):35-42.
39. Peters U, Hutter CM, Hsu L, Schumacher FR, Conti DV, Carlson CS, et al. Meta-analysis of new genome-wide association studies of colorectal cancer risk. *Hum Genet*. 2012;131(2):217-34.
40. Win AK, Lindor NM, Young JP, Macrae FA, Young GP, Williamson E, et al. Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(18):1363-72.
41. Dowty JG, Win AK, Buchanan DD, Lindor NM, Macrae FA, Clendenning M, et al. Cancer risks for MLH1 and MSH2 mutation carriers. *Hum Mutat*. 2013;34(3):490-7.
42. Ricciardiello L, Ahnen DJ, Lynch PM. Chemoprevention of hereditary colon cancers: time for new strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(6):352-61.
43. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(2):385-98.

44. Lynch HT, Smyrk T, McGinn T, Lanspa S, Cavalieri J, Lynch J, et al. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer*. 1995;76(12):2427-33.
45. Lipton L, Halford SE, Johnson V, Novelli MR, Jones A, Cummings C, et al. Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res*. 2003;63(22):7595-9.
46. Valle L. Genetic predisposition to colorectal cancer: where we stand and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;20(29):9828-49.
47. Lynch HT, Lynch JF, Attard TA. Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model. *CMAJ*. 2009;181(5):273-80.
48. Hampel H, de la Chapelle A. The search for unaffected individuals with Lynch syndrome: do the ends justify the means? *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(1):1-5.
49. Barzi A, Sadeghi S, Kattan MW, Meropol NJ. Comparative effectiveness of screening strategies for Lynch syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(4).
50. Murff HJ, Greevy RA, Syngal S. The comprehensiveness of family cancer history assessments in primary care. *Community Genet*. 2007;10(3):174-80.
51. Volk LA, Staroselsky M, Newmark LP, Pham H, Tumolo A, Williams DH, et al. Do physicians take action on high risk family history information provided by patients outside of a clinic visit? *Stud Health Technol Inform*. 2007;129(Pt 1):13-7.
52. Wood ME, Kadluek P, Pham TH, Wollins DS, Lu KH, Weitzel JN, et al. Quality of cancer family history and referral for genetic counseling and testing among oncology practices: a pilot test of quality measures as part of the American Society of Clinical Oncology Quality Oncology Practice Initiative. *J Clin Oncol*. 2014;32(8):824-9.
53. Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, Aktan-Collan K, Aaltonen LA, Peltomäki P, et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2000;118(5):829-34.
54. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1453-6.
55. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(4):261-8.
56. Ren J, Kirkness CS, Kim M, Asche CV, Puli S. Long-term risk of colorectal cancer by gender after positive colonoscopy: population-based cohort study. *Curr Med Res Opin*. 2016;32(8):1367-74.
57. Lutgens MW, van Oijen MG, van der Heijden GJ, Vleggaar FP, Siersema PD, Oldenburg B. Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(4):789-99.
58. Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancers Complicating Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med*. 2015;373(2):195.
59. Castaño-Milla C, Chaparro M, Gisbert JP. Systematic review with meta-analysis: the declining risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39(7):645-59.
60. Tsilidis KK, Kasimis JC, Lopez DS, Ntzani EE, Ioannidis JP. Type 2 diabetes and cancer: umbrella review of meta-analyses of observational studies. *BMJ*. 2015;350:g7607.
61. Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Diabetes and colorectal cancer incidence in the cohort of Swedish men. *Diabetes Care*. 2005;28(7):1805-7.
62. Yang YX, Hennessy S, Lewis JD. Insulin therapy and colorectal cancer risk among type 2 diabetes mellitus patients. *Gastroenterology*. 2004;127(4):1044-50.
63. Wang L, Cai S, Teng Z, Zhao X, Chen X, Bai X. Insulin therapy contributes to the increased risk of colorectal cancer in diabetes patients: a meta-analysis. *Diagn Pathol*. 2013;8:180.
64. Currie CJ, Poole CD, Gale EA. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52(9):1766-77.

## BIBLIOGRAFÍA

65. Bella F, Minicozzi P, Giacomini A, Crocetti E, Federico M, Ponz de Leon M, et al. Impact of diabetes on overall and cancer-specific mortality in colorectal cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(8):1303-10.
66. Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(20):1548-61.
67. Røsbjerg TE, Aagnes B, Hjartåker A, Langseth H, Bray FI, Larsen IK. Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer Prev*. 2013;22(6):492-505.
68. Campbell PT, Patel AV, Newton CC, Jacobs EJ, Gapstur SM. Associations of recreational physical activity and leisure time spent sitting with colorectal cancer survival. *J Clin Oncol*. 2013;31(7):876-85.
69. Schmid D, Leitzmann MF. Television viewing and time spent sedentary in relation to cancer risk: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(7).
70. Chao A, Connell CJ, Jacobs EJ, McCullough ML, Patel AV, Calle EE, et al. Amount, type, and timing of recreational physical activity in relation to colon and rectal cancer in older adults: the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(12):2187-95.
71. Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, et al. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS One*. 2013;8(1):e53916.
72. Larsson SC, Wolk A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(3):556-65.
73. Keum N, Lee DH, Kim R, Greenwood DC, Giovannucci EL. Visceral adiposity and colorectal adenomas: dose-response meta-analysis of observational studies. *Ann Oncol*. 2015;26(6):1101-9.
74. Renehan AG, Flood A, Adams KF, Olden M, Hollenbeck AR, Cross AJ, et al. Body mass index at different adult ages, weight change, and colorectal cancer risk in the National Institutes of Health-AARP Cohort. *Am J Epidemiol*. 2012;176(12):1130-40.
75. Murphy N, Cross AJ, Abubakar M, Jenab M, Aleksandrova K, Boutron-Ruault MC, et al. A Nested Case-Control Study of Metabolically Defined Body Size Phenotypes and Risk of Colorectal Cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *PLoS Med*. 2016;13(4):e1001988.
76. Cespedes Feliciano EM, Kroenke CH, Meyerhardt JA, Prado CM, Bradshaw PT, Dannenberg AJ, et al. Metabolic Dysfunction, Obesity, and Survival Among Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2016.
77. Secretan B, Straif K, Baan R, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol*. 2009;10(11):1033-4.
78. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009;124(10):2406-15.
79. Limsui D, Vierkant RA, Tillmans LS, Wang AH, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(14):1012-22.
80. Walter V, Jansen L, Hoffmeister M, Brenner H. Smoking and survival of colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1517-25.
81. Yang B, Jacobs EJ, Gapstur SM, Stevens V, Campbell PT. Active smoking and mortality among colorectal cancer survivors: the Cancer Prevention Study II nutrition cohort. *J Clin Oncol*. 2015;33(8):885-93.
82. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol*. 2013;24(2):301-8.
83. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*. 2015;112(3):580-93.
84. O'Keefe SJ. Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(12):691-706.

85. O'Keefe SJ, Li JV, Lahti L, Ou J, Carbonero F, Mohammed K, et al. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nat Commun*. 2015;6:6342.
86. Tilg H, Moschen AR. Food, immunity, and the microbiome. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1107-19.
87. Brennan CA, Garrett WS. Gut Microbiota, Inflammation, and Colorectal Cancer. *Annu Rev Microbiol*. 2016;70:395-411.
88. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1244-60.e16.
89. Carroll C, Cooper K, Papaioannou D, Hind D, Pilgrim H, Tappenden P. Supplemental calcium in the chemoprevention of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Ther*. 2010;32(5):789-803.
90. Tsuda H, Kozu T, Iinuma G, Ohashi Y, Saito Y, Saito D, et al. Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial. *Biometals*. 2010;23(3):399-409.
91. Norat T, Riboli E. Dairy products and colorectal cancer. A review of possible mechanisms and epidemiological evidence. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57(1):1-17.
92. Touvier M, Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, et al. Meta-analyses of vitamin D intake, 25-hydroxyvitamin D status, vitamin D receptor polymorphisms, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(5):1003-16.
93. Keum N, Lee DH, Greenwood DC, Zhang X, Giovannucci EL. Calcium intake and colorectal adenoma risk: dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *Int J Cancer*. 2015;136(7):1680-7.
94. El-Shami K, Oeffinger KC, Erb NL, Willis A, Bretsch JK, Pratt-Chapman ML, et al. American Cancer Society Colorectal Cancer Survivorship Care Guidelines. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(6):428-55.
95. Mason JB, Dickstein A, Jacques PF, Haggarty P, Selhub J, Dallal G, et al. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(7):1325-9.
96. Vollset SE, Clarke R, Lewington S, Ebbing M, Halsey J, Lonn E, et al. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50,000 individuals. *Lancet*. 2013;381(9871):1029-36.
97. Jacobs EJ, Connell CJ, Chao A, McCullough ML, Rodriguez C, Thun MJ, et al. Multivitamin use and colorectal cancer incidence in a US cohort: does timing matter? *Am J Epidemiol*. 2003;158(7):621-8.
98. Aune D, Lau R, Chan DS, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Nonlinear reduction in risk for colorectal cancer by fruit and vegetable intake based on meta-analysis of prospective studies. *Gastroenterology*. 2011;141(1):106-18.
99. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*. 2011;6(6):e20456.
100. Kim E, Coelho D, Blachier F. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutr Res*. 2013;33(12):983-94.
101. Hooda J, Shah A, Zhang L. Heme, an essential nutrient from dietary proteins, critically impacts diverse physiological and pathological processes. *Nutrients*. 2014;6(3):1080-102.
102. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi FE, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol*. 2015;16(16):1599-600.
103. Lamprecht SA, Lipkin M. Cellular mechanisms of calcium and vitamin D in the inhibition of colorectal carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;952:73-87.
104. Zhang XH, Ma J, Smith-Warner SA, Lee JE, Giovannucci E. Vitamin B6 and colorectal cancer: current evidence and future directions. *World J Gastroenterol*. 2013;19(7):1005-10.
105. Fischer SM, Hawk ET, Lubet RA. Coxibs and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs in animal models of cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(11):1728-35.

## BIBLIOGRAFÍA

106. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet*. 2010;376(9754):1741-50.
107. Cook NR, Lee IM, Zhang SM, Moorthy MV, Buring JE. Alternate-day, low-dose aspirin and cancer risk: long-term observational follow-up of a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2013;159(2):77-85.
108. Hildebrand JS, Jacobs EJ, Campbell PT, McCullough ML, Teras LR, Thun MJ, et al. Colorectal cancer incidence and postmenopausal hormone use by type, recency, and duration in cancer prevention study II. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(11):2835-41.
109. Lavasani S, Chlebowski RT, Prentice RL, Kato I, Wactawski-Wende J, Johnson KC, et al. Estrogen and colorectal cancer incidence and mortality. *Cancer*. 2015;121(18):3261-71.
110. Brändstedt J, Wangefjord S, Nodin B, Eberhard J, Jirström K, Manjer J. Associations of hormone replacement therapy and oral contraceptives with risk of colorectal cancer defined by clinicopathological factors, beta-catenin alterations, expression of cyclin D1, p53, and microsatellite-instability. *BMC Cancer*. 2014;14:371.
111. Charlton BM, Wu K, Zhang X, Giovannucci EL, Fuchs CS, Missmer SA, et al. Oral contraceptive use and colorectal cancer in the Nurses' Health Study I and II. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015;24(8):1214-21.
112. Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*. 1975;36(6):2251-70.
113. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology*. 1987;93(5):1009-13.
114. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1993;329(27):1977-81.
115. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
116. Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, et al. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med*. 1998;339(18):1277-84.
117. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2059-72.
118. Chang WW. Histogenesis of colon cancer in experimental animals. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1984;104:27-43.
119. Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*. 1987;37(2):147-51.
120. Lopez-Ceron M, Pellise M. Biology and diagnosis of aberrant crypt foci. *Colorectal Dis*. 2012;14(4):e157-64.
121. Nucci MR, Robinson CR, Longo P, Campbell P, Hamilton SR. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum Pathol*. 1997;28(12):1396-407.
122. Suehiro Y, Hinoda Y. Genetic and epigenetic changes in aberrant crypt foci and serrated polyps. *Cancer Sci*. 2008;99(6):1071-6.
123. Boparai KS, Mathus-Vliegen EM, Koornstra JJ, Nagengast FM, van Leerdam M, van Noesel CJ, et al. Increased colorectal cancer risk during follow-up in patients with hyperplastic polyposis syndrome: a multicentre cohort study. *Gut*. 2010;59(8):1094-100.
124. Schreiner MA, Weiss DG, Lieberman DA. Proximal and large hyperplastic and nondysplastic serrated polyps detected by colonoscopy are associated with neoplasia. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1497-502.
125. Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 1990;14(6):524-37.
126. Torlakovic E, Snover DC. Serrated adenomatous polyposis in humans. *Gastroenterology*. 1996;110(3):748-55.
127. Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(1):65-81.

128. Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(3):380-91.
129. Lambert R, Kudo SE, Vieth M, Allen JI, Fujii H, Fujii T, et al. Pragmatic classification of superficial neoplastic colorectal lesions. *Gastrointest Endosc.* 2009;70(6):1182-99.
130. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. *N Engl J Med.* 2002;346(23):1781-5.
131. O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, et al. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(12):1491-501.
132. Boparai KS, Dekker E, Van Eeden S, Polak MM, Bartelsman JF, Mathus-Vliegen EM, et al. Hyperplastic polyps and sessile serrated adenomas as a phenotypic expression of MYH-associated polyposis. *Gastroenterology.* 2008;135(6):2014-8.
133. Fujita K, Yamamoto H, Matsumoto T, Hirahashi M, Gushima M, Kishimoto J, et al. Sessile serrated adenoma with early neoplastic progression: a clinicopathologic and molecular study. *Am J Surg Pathol.* 2011;35(2):295-304.
134. Spring KJ, Zhao ZZ, Karamatic R, Walsh MD, Whitehall VL, Pike T, et al. High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing colonoscopy. *Gastroenterology.* 2006;131(5):1400-7.
135. Higuchi T, Sugihara K, Jass JR. Demographic and pathological characteristics of serrated polyps of colorectum. *Histopathology.* 2005;47(1):32-40.
136. Torlakovic EE, Gomez JD, Driman DK, Parfitt JR, Wang C, Benerjee T, et al. Sessile serrated adenoma (SSA) vs. traditional serrated adenoma (TSA). *Am J Surg Pathol.* 2008;32(1):21-9.
137. Kim KM, Lee EJ, Kim YH, Chang DK, Odze RD. KRAS mutations in traditional serrated adenomas from Korea herald an aggressive phenotype. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(5):667-75.
138. Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2088-100.
139. Hawkins NJ, Ward RL. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(17):1307-13.
140. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res.* 2005;65(14):6063-9.
141. O'Brien MJ, Yang S, Clebanoff JL, Mulcahy E, Farraye FA, Amorosino M, et al. Hyperplastic (serrated) polyps of the colorectum: relationship of CpG island methylator phenotype and K-ras mutation to location and histologic subtype. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(4):423-34.
142. Minoo P, Jass JR. Senescence and serration: a new twist to an old tale. *J Pathol.* 2006;210(2):137-40.
143. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-54.
144. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006;38(7):787-93.
145. Merok MA, Ahlquist T, Røyrvik EC, Tufteland KF, Hektoen M, Sjø OH, et al. Microsatellite instability has a positive prognostic impact on stage II colorectal cancer after complete resection: results from a large, consecutive Norwegian series. *Ann Oncol.* 2013;24(5):1274-82.
146. Carragher LA, Snell KR, Giblett SM, Aldridge VS, Patel B, Cook SJ, et al. V600EBraf induces gastrointestinal crypt senescence and promotes tumour progression through enhanced CpG methylation of p16INK4a. *EMBO Mol Med.* 2010;2(11):458-71.

## BIBLIOGRAFÍA

147. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005;436(7051):725-30.
148. Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*. 2008;132(3):363-74.
149. Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, et al. IGFBP7 is a p53-responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. *Carcinogenesis*. 2010;31(3):342-9.
150. O'Brien MJ. Hyperplastic and serrated polyps of the colorectum. *Gastroenterol Clin North Am*. 2007;36(4):947-68, viii.
151. East JE, Saunders BP, Jass JR. Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008;37(1):25-46, v.
152. Brenner H, Hoffmeister M, Arndt V, Stegmaier C, Altenhofen L, Haug U. Protection from right- and left-sided colorectal neoplasms after colonoscopy: population-based study. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(2):89-95.
153. Sawhney MS, Farrar WD, Gudiseva S, Nelson DB, Lederle FA, Rector TS, et al. Microsatellite instability in interval colon cancers. *Gastroenterology*. 2006;131(6):1700-5.
154. Arain MA, Sawhney M, Sheikh S, Anway R, Thyagarajan B, Bond JH, et al. CIMP status of interval colon cancers: another piece to the puzzle. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(5):1189-95.
155. Carethers JM, Stoffel EM. Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2015;21(31):9253-61.
156. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol*. 2001;3(4):433-8.
157. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology*. 2015;148(1):88-99.
158. Duesberg P, Fabarius A, Hehlmann R. Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life*. 2004;56(2):65-81.
159. Bardelli A, Cahill DP, Lederer G, Speicher MR, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Carcinogen-specific induction of genetic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(10):5770-5.
160. Taylor SS, McKeon F. Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*. 1997;89(5):727-35.
161. Castillo A, Morse HC, Godfrey VL, Naeem R, Justice MJ. Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. *Cancer Res*. 2007;67(21):10138-47.
162. Plentz RR, Wiemann SU, Flemming P, Meier PN, Kubicka S, Kreipe H, et al. Telomere shortening of epithelial cells characterises the adenoma-carcinoma transition of human colorectal cancer. *Gut*. 2003;52(9):1304-7.
163. Gertler R, Rosenberg R, Stricker D, Friederichs J, Hoos A, Werner M, et al. Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. *J Clin Oncol*. 2004;22(10):1807-14.
164. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;396(6712):643-9.
165. Thiagalingam S, Laken S, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2698-702.
166. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001;27(3):247-54.
167. Zha S, Sekiguchi J, Brush JW, Bassing CH, Alt FW. Complementary functions of ATM and H2AX in development and suppression of genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(27):9302-6.

168. Peddibhotla S, Lam MH, Gonzalez-Rimbau M, Rosen JM. The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(13):5159-64.
169. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2007;318(5853):1108-13.
170. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 1992;359(6392):235-7.
171. Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, Tanaka K, et al. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res*. 1994;54(11):3011-20.
172. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87(2):159-70.
173. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*. 1992;1(4):229-33.
174. Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res*. 2000;60(16):4366-71.
175. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(6):1130-4.
176. Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, et al. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet*. 2004;74(5):1043-50.
177. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):459-65.
178. Pretlow TP, Pretlow TG. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta*. 2005;1756(2):83-96.
179. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-32.
180. Hung KE, Maricevich MA, Richard LG, Chen WY, Richardson MP, Kunin A, et al. Development of a mouse model for sporadic and metastatic colon tumors and its use in assessing drug treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(4):1565-70.
181. Pruitt K, Der CJ. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett*. 2001;171(1):1-10.
182. Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature*. 2009;462(7269):108-12.
183. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*. 2002;89(7):845-60.
184. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307-10.
185. Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol*. 2004;22(16):3420-8.
186. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature*. 1998;395(6704):801-4.
187. Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, et al. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature*. 1997;386(6627):796-804.
188. Castets M, Broutier L, Molin Y, Brevet M, Chazot G, Gadot N, et al. DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature*. 2011;482(7386):534-7.
189. Takagi Y, Koumura H, Futamura M, Aoki S, Ymaguchi K, Kida H, et al. Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br J Cancer*. 1998;78(9):1152-5.
190. Merg A, Howe JR. Genetic conditions associated with intestinal juvenile polyps. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2004;129C(1):44-55.



## BIBLIOGRAFÍA

191. Park DY, Sakamoto H, Kirley SD, Ogino S, Kawasaki T, Kwon E, et al. The Cables gene on chromosome 18q is silenced by promoter hypermethylation and allelic loss in human colorectal cancer. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1509-19.
192. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):2011-9.
193. Li HT, Lu YY, An YX, Wang X, Zhao QC. KRAS, BRAF and PIK3CA mutations in human colorectal cancer: relationship with metastatic colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2011;25(6):1691-7.
194. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer.* 2005;92(3):434-44.
195. Ogino S, Noshio K, Irahara N, Shima K, Baba Y, Kirkner GJ, et al. Prognostic significance and molecular associations of 18q loss of heterozygosity: a cohort study of microsatellite stable colorectal cancers. *J Clin Oncol.* 2009;27(27):4591-8.
196. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(17):1757-65.
197. Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(1):98-9.
198. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993;363(6429):558-61.
199. Blake C, Tsao JL, Wu A, Shibata D. Stepwise deletions of polyA sequences in mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Am J Pathol.* 2001;158(5):1867-70.
200. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science.* 1989;244(4901):207-11.
201. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2073-87.e3.
202. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med.* 2005;352(18):1851-60.
203. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8698-702.
204. Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, et al. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology.* 2006;131(3):729-37.
205. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer.* 2011;117(20):4623-32.
206. Kakar S, Burgart LJ, Thibodeau SN, Rabe KG, Petersen GM, Goldberg RM, et al. Frequency of loss of hMLH1 expression in colorectal carcinoma increases with advancing age. *Cancer.* 2003;97(6):1421-7.
207. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science.* 1995;268(5215):1336-8.
208. Cuilliere-Dartigues P, El-Bchiri J, Krimi A, Buhard O, Fontanges P, Fléjou JF, et al. TCF-4 isoforms absent in TCF-4 mutated MSI-H colorectal cancer cells colocalize with nuclear CtBP and repress TCF-4-mediated transcription. *Oncogene.* 2006;25(32):4441-8.
209. Shima K, Morikawa T, Yamauchi M, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, et al. TGFBR2 and BAX mononucleotide tract mutations, microsatellite instability, and prognosis in 1072 colorectal cancers. *PLoS One.* 2011;6(9):e25062.

210. Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri C, Dale D, et al. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res.* 1999;59(14):3346-51.
211. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58(22):5248-57.
212. Ahrendt SA, Decker PA, Doffek K, Wang B, Xu L, Demeure MJ, et al. Microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats is associated with p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2000;60(9):2488-91.
213. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn.* 2008;10(4):293-300.
214. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res.* 2009;15(20):6412-20.
215. Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, Groden J, Meuth M. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(14):6319-23.
216. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet.* 2000;355(9217):1745-50.
217. Des Guetz G, Lecaille C, Mariani P, Bennamoun M, Uzzan B, Nicolas P, et al. Prognostic impact of microsatellite instability in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX. *Anticancer Res.* 2010;30(10):4297-301.
218. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med.* 2003;349(3):247-57.
219. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol.* 2009;27(11):1814-21.
220. Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol.* 1999;9(5):349-57.
221. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 1986;321(6067):209-13.
222. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology.* 2005;129(3):837-45.
223. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, Burt RW, et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(9):1315-29; quiz 4, 30.
224. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut.* 2009;58(1):90-6.
225. Dahlin AM, Palmqvist R, Henriksson ML, Jacobsson M, Eklöf V, Rutegård J, et al. The role of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer prognosis depends on microsatellite instability screening status. *Clin Cancer Res.* 2010;16(6):1845-55.
226. Lind GE, Danielsen SA, Ahlquist T, Merok MA, Andresen K, Skotheim RI, et al. Identification of an epigenetic biomarker panel with high sensitivity and specificity for colorectal cancer and adenomas. *Mol Cancer.* 2011;10:85.
227. Ide T, Kitajima Y, Ohtaka K, Mitsuno M, Nakafusa Y, Miyazaki K. Expression of the hMLH1 gene is a possible predictor for the clinical response to 5-fluorouracil after a surgical resection in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2008;19(6):1571-6.

## BIBLIOGRAFÍA

228. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997;57(5):808-11.
229. Winawer SJ. The history of colorectal cancer screening: a personal perspective. *Dig Dis Sci.* 2015;60(3):596-608.
230. Dickinson BT, Kisiel J, Ahlquist DA, Grady WM. Molecular markers for colorectal cancer screening. *Gut.* 2015;64(9):1485-94.
231. Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Davidson KW, Epling JW, García FAR, et al. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA.* 2016;315(23):2564-75.
232. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology.* 2008;134(5):1570-95.
233. Qaseem A, Denberg TD, Hopkins RH, Humphrey LL, Levine J, Sweet DE, et al. Screening for colorectal cancer: a guidance statement from the American College of Physicians. *Ann Intern Med.* 2012;156(5):378-86.
234. Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, Schoenfeld PS, Burke CA, Inadomi JM, et al. American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(3):739-50.
235. Shaikat A, Mongin SJ, Geisser MS, Lederle FA, Bond JH, Mandel JS, et al. Long-term mortality after screening for colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2013;369(12):1106-14.
236. Vleugels JL, van Lanschot MC, Dekker E. Colorectal cancer screening by colonoscopy: putting it into perspective. *Dig Endosc.* 2016;28(3):250-9.
237. Armaroli P, Villain P, Suonio E, Almonte M, Anttila A, Atkin WS, et al. European Code against Cancer, 4th Edition: Cancer screening. *Cancer Epidemiol.* 2015;39 Suppl 1:S139-52.
238. Sabatino SA, White MC, Thompson TD, Klabunde CN, (CDC) CfDCaP. Cancer screening test use - United States, 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64(17):464-8.
239. Holme Ø, Løberg M, Kalager M, Bretthauer M, Hernán MA, Aas E, et al. Effect of flexible sigmoidoscopy screening on colorectal cancer incidence and mortality: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2014;312(6):606-15.
240. Cheng L, Eng C, Nieman LZ, Kapadia AS, Du XL. Trends in colorectal cancer incidence by anatomic site and disease stage in the United States from 1976 to 2005. *Am J Clin Oncol.* 2011;34(6):573-80.
241. Pox CP. Controversies in colorectal cancer screening. *Digestion.* 2014;89(4):274-81.
242. Farraye FA, Adler DG, Chand B, Conway JD, Diehl DL, Kantsevov SV, et al. Update on CT colonography. *Gastrointest Endosc.* 2009;69(3 Pt 1):393-8.
243. Yee J, Weinstein S, Morgan T, Alore P, Aslam R. Advances in CT Colonography for Colorectal Cancer Screening and Diagnosis. *J Cancer.* 2013;4(3):200-9.
244. Rabeneck L, Rumble RB, Thompson F, Mills M, Oleschuk C, Whibley A, et al. Fecal immunochemical tests compared with guaiac fecal occult blood tests for population-based colorectal cancer screening. *Can J Gastroenterol.* 2012;26(3):131-47.
245. Hol L, van Leerdam ME, van Ballegooijen M, van Vuuren AJ, van Dekken H, Reijerink JC, et al. Screening for colorectal cancer: randomised trial comparing guaiac-based and immunochemical faecal occult blood testing and flexible sigmoidoscopy. *Gut.* 2010;59(1):62-8.
246. van der Steen A, Knudsen AB, van Hees F, Walter GP, Berger FG, Daguis VG, et al. Optimal colorectal cancer screening in states' low-income, uninsured populations—the case of South Carolina. *Health Serv Res.* 2015;50(3):768-89.
247. Young GP, Symonds EL, Allison JE, Cole SR, Fraser CG, Halloran SP, et al. Advances in Fecal Occult Blood Tests: the FIT revolution. *Dig Dis Sci.* 2015;60(3):609-22.
248. Wong MC, Ching JY, Chan VC, Sung JJ. The comparative cost-effectiveness of colorectal cancer screening using faecal immunochemical test vs. colonoscopy. *Sci Rep.* 2015;5:13568.

249. Kurzawski G, Suchy J, Debnia T, Kładny J, Lubiński J. Importance of microsatellite instability (MSI) in colorectal cancer: MSI as a diagnostic tool. *Ann Oncol.* 2004;15 Suppl 4:iv283-4.
250. Dhaliwal A, Vlachostergios PJ, Oikonomou KG, Moshenyat Y. Fecal DNA testing for colorectal cancer screening: Molecular targets and perspectives. *World J Gastrointest Oncol.* 2015;7(10):178-83.
251. Ahlquist DA. Multi-target stool DNA test: a new high bar for noninvasive screening. *Dig Dis Sci.* 2015;60(3):623-33.
252. Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem.* 2008;54(2):414-23.
253. Marshall KW, Mohr S, Khettabi FE, Nossova N, Chao S, Bao W, et al. A blood-based biomarker panel for stratifying current risk for colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010;126(5):1177-86.
254. Heichman KA. Blood-based testing for colorectal cancer screening. *Mol Diagn Ther.* 2014;18(2):127-35.
255. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME, Group CCS. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2704-14.
256. Lidgard GP, Domanico MJ, Bruinsma JJ, Light J, Gagrut ZD, Oldham-Haltom RL, et al. Clinical performance of an automated stool DNA assay for detection of colorectal neoplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(10):1313-8.
257. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology.* 2003;124(2):544-60.
258. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW, et al. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol.* 2015;110(2):223-62; quiz 63.
259. Fedewa SA, Sauer AG, Siegel RL, Jemal A. Prevalence of major risk factors and use of screening tests for cancer in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015;24(4):637-52.
260. Jerant AF, Fenton JJ, Franks P. Determinants of racial/ethnic colorectal cancer screening disparities. *Arch Intern Med.* 2008;168(12):1317-24.
261. Laiyemo AO, Adebogun AO, Doubeni CA, Ricks-Santi L, McDonald-Pinkett S, Young PE, et al. Influence of provider discussion and specific recommendation on colorectal cancer screening uptake among U.S. adults. *Prev Med.* 2014;67:1-5.
262. Gupta S, Halm EA, Rockey DC, Hammons M, Koch M, Carter E, et al. Comparative effectiveness of fecal immunochemical test outreach, colonoscopy outreach, and usual care for boosting colorectal cancer screening among the underserved: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med.* 2013;173(18):1725-32.
263. Dietel M, Jöhrens K, Laffert MV, Hummel M, Bläker H, Pfitzner BM, et al. A 2015 update on predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Ther.* 2015;22(9):417-30.
264. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009;6(9):519-27.
265. Newton KF, Newman W, Hill J. Review of biomarkers in colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2012;14(1):3-17.
266. Jancík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:150960.
267. Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1177-95.
268. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006;66(8):3992-5.

## BIBLIOGRAFÍA

269. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(10):1626-34.
270. Smith G, Bounds R, Wolf H, Steele RJ, Carey FA, Wolf CR. Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours - implications for personalised cancer medicine. *Br J Cancer*. 2010;102(4):693-703.
271. Shackelford RE, Whitling NA, McNab P, Japa S, Coppola D. KRAS Testing: A Tool for the Implementation of Personalized Medicine. *Genes Cancer*. 2012;3(7-8):459-66.
272. Pinto P, Rocha P, Veiga I, Guedes J, Pinheiro M, Peixoto A, et al. Comparison of methodologies for KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Genet*. 2011;204(8):439-46.
273. Weichert W, Schewe C, Lehmann A, Sers C, Denkert C, Budczies J, et al. KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology. *J Mol Diagn*. 2010;12(1):35-42.
274. Van Krieken JH, Rouleau E, Ligtenberg MJ, Normanno N, Patterson SD, Jung A. RAS testing in metastatic colorectal cancer: advances in Europe. *Virchows Arch*. 2016;468(4):383-96.
275. Franklin WA, Haney J, Sugita M, Bemis L, Jimeno A, Messersmith WA. KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. *J Mol Diagn*. 2010;12(1):43-50.
276. Morlan J, Baker J, Sinicropi D. Mutation detection by real-time PCR: a simple, robust and highly selective method. *PLoS One*. 2009;4(2):e4584.
277. Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(19):3752-61.
278. Milbury CA, Li J, Makrigiorgos GM. PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations. *Clin Chem*. 2009;55(4):632-40.
279. Mancini I, Pinzani P, Simi L, Brandslund I, Vermeersch P, Di Resta C, et al. Implementation of a companion diagnostic in the clinical laboratory: the BRAF example in melanoma. *Clin Chim Acta*. 2015;439:128-36.
280. Dominguez PL, Kolodney MS. Wild-type blocking polymerase chain reaction for detection of single nucleotide minority mutations from clinical specimens. *Oncogene*. 2005;24(45):6830-4.
281. Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos GM. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med*. 2008;14(5):579-84.
282. Heideman DA, Lurkin I, Doeleman M, Smit EF, Verheul HM, Meijer GA, et al. KRAS and BRAF mutation analysis in routine molecular diagnostics: comparison of three testing methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor-derived DNA. *J Mol Diagn*. 2012;14(3):247-55.
283. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*. 2011;83(22):8604-10.
284. Parris BA, Shaw E, Pang B, Soong R, Fong K, Soo RA. Somatic mutations and immune checkpoint biomarkers. *Respirology*. 2019.
285. Sassolas A, Leca-Bouvier BD, Blum LJ. DNA biosensors and microarrays. *Chem Rev*. 2008;108(1):109-39.
286. Galbiati S, Damin F, Pinzani P, Mancini I, Vinci S, Chiari M, et al. A new microarray substrate for ultra-sensitive genotyping of KRAS and BRAF gene variants in colorectal cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e59939.
287. Weyant GW, Wisotzkey JD, Benko FA, Donaldson KJ. BRAF mutation testing in solid tumors: a methodological comparison. *J Mol Diagn*. 2014;16(5):481-5.
288. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med*. 2013;10(5):e1001453.

289. Budinska E, Popovici V, Tejpar S, D'Ario G, Lapique N, Sikora KO, et al. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J Pathol.* 2013;231(1):63-76.
290. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350-6.
291. Sinicrope FA, Okamoto K, Kasi PM, Kawakami H. Molecular Biomarkers in the Personalized Treatment of Colorectal Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14(5):651-8.
292. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, Burnett-Hartman AN, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology.* 2015;148(1):77-87.e2.
293. Vedeld HM, Merok M, Jeanmougin M, Danielsen SA, Honne H, Presthus GK, et al. CpG island methylator phenotype identifies high risk patients among microsatellite stable BRAF mutated colorectal cancers. *Int J Cancer.* 2017;141(5):967-76.
294. Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg.* 1982;69(10):613-6.
295. Augestad KM, Lindsetmo RO, Reynolds H, Stulberg J, Senagore A, Champagne B, et al. International trends in surgical treatment of rectal cancer. *Am J Surg.* 2011;201(3):353-7; discussion 7-8.
296. Lange MM, Buunen M, van de Velde CJ, Lange JF. Level of arterial ligation in rectal cancer surgery: low tie preferred over high tie. A review. *Dis Colon Rectum.* 2008;51(7):1139-45.
297. Hohenberger W, Weber K, Matzel K, Papadopoulos T, Merkel S. Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation--technical notes and outcome. *Colorectal Dis.* 2009;11(4):354-64; discussion 64-5.
298. Merkel S, Weber K, Matzel KE, Agaimy A, Göhl J, Hohenberger W. Prognosis of patients with colonic carcinoma before, during and after implementation of complete mesocolic excision. *Br J Surg.* 2016;103(9):1220-9.
299. Nesgaard JM, Stimec BV, Bakka AO, Edwin B, Ignjatovic D, group Rs. Navigating the mesentery: a comparative pre- and per-operative visualization of the vascular anatomy. *Colorectal Dis.* 2015;17(9):810-8.
300. McCarthy K, Pearson K, Fulton R, Hewitt J. Pre-operative chemoradiation for non-metastatic locally advanced rectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;12:CD008368.
301. Petersen SH, Harling H, Kirkeby LT, Wille-Jørgensen P, Mocellin S. Postoperative adjuvant chemotherapy in rectal cancer operated for cure. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012(3):CD004078.
302. Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, Das P, Rödel C, Kuo LJ, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2010;11(9):835-44.
303. Perez RO, Habr-Gama A, São Julião GP, Vailati BB, Fernandez LM, Gama-Rodrigues J, et al. Should We Give Up The Search for a Clinically Useful Gene Signature for the Prediction of Response of Rectal Cancer to Neoadjuvant Chemoradiation? *Dis Colon Rectum.* 2016;59(9):895-7.
304. Poston GJ, Figueras J, Giulianti F, Nuzzo G, Sobrero AF, Gigot JF, et al. Urgent need for a new staging system in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(29):4828-33.
305. Ortega J, Vigil CE, Chodkiewicz C. Current progress in targeted therapy for colorectal cancer. *Cancer Control.* 2010;17(1):7-15.
306. Okamoto I. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR-targeted anticancer therapy. *FEBS J.* 2010;277(2):309-15.
307. Jaka A, Gutiérrez-Rivera A, López-Pestaña A, del Alcázar E, Zubizarreta J, Vildosola S, et al. Predictors of Tumor Response to Cetuximab and Panitumumab in 116 Patients and a Review of Approaches to Managing Skin Toxicity. *Actas Dermosifiliogr.* 2015;106(6):483-92.
308. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(7):1254-61.

## BIBLIOGRAFÍA

309. Peeters M, Price T, Van Laethem JL. Anti-epidermal growth factor receptor monotherapy in the treatment of metastatic colorectal cancer: where are we today? *Oncologist*. 2009;14(1):29-39.
310. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(5):663-71.
311. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2008;9(10):962-72.
312. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 2009;69(5):1851-7.
313. Razis E, Briasoulis E, Vrettou E, Skarlos DV, Papamichael D, Kostopoulos I, et al. Potential value of PTEN in predicting cetuximab response in colorectal cancer: an exploratory study. *BMC Cancer*. 2008;8:234.
314. Kawai K, Ishihara S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Miyata H, et al. Nomogram prediction of metachronous colorectal neoplasms in patients with colorectal cancer. *Ann Surg*. 2015;261(5):926-32.
315. Storli KE, Søndena K, Bukholm IR, Nesvik I, Bru T, Furnes B, et al. Overall survival after resection for colon cancer in a national cohort study was adversely affected by TNM stage, lymph node ratio, gender, and old age. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26(10):1299-307.
316. Sloan JA, Goldberg RM, Sargent DJ, Vargas-Chanes D, Nair S, Cha SS, et al. Women experience greater toxicity with fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(6):1491-8.
317. Chang DT, Pai RK, Rybicki LA, Dimaio MA, Limaye M, Jayachandran P, et al. Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet ring cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features. *Mod Pathol*. 2012;25(8):1128-39.
318. O'Connell JB, Maggard MA, Liu JH, Etzioni DA, Livingston EH, Ko CY. Do young colon cancer patients have worse outcomes? *World J Surg*. 2004;28(6):558-62.
319. Rose J, Augestad KM, Kong CY, Meropol NJ, Kattan MW, Hong Q, et al. A simulation model of colorectal cancer surveillance and recurrence. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2014;14:29.
320. Tan E, Gouvas N, Nicholls RJ, Ziprin P, Xynos E, Tekkis PP. Diagnostic precision of carcinoembryonic antigen in the detection of recurrence of colorectal cancer. *Surg Oncol*. 2009;18(1):15-24.
321. Augestad KM, Bakaki PM, Rose J, Crawshaw BP, Lindsetmo RO, Dørum LM, et al. Metastatic spread pattern after curative colorectal cancer surgery. A retrospective, longitudinal analysis. *Cancer Epidemiol*. 2015;39(5):734-44.
322. Ding P, Liska D, Tang P, Shia J, Saltz L, Goodman K, et al. Pulmonary recurrence predominates after combined modality therapy for rectal cancer: an original retrospective study. *Ann Surg*. 2012;256(1):111-6.
323. Hugen N, van de Velde CJ, de Wilt JH, Nagtegaal ID. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann Oncol*. 2014;25(3):651-7.
324. Goldstein NS. Lymph node recoveries from 2427 pT3 colorectal resection specimens spanning 45 years: recommendations for a minimum number of recovered lymph nodes based on predictive probabilities. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(2):179-89.
325. Sjo OH, Merok MA, Svindland A, Nesbakken A. Prognostic impact of lymph node harvest and lymph node ratio in patients with colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2012;55(3):307-15.
326. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471-4.

327. Song YX, Gao P, Wang ZN, Liang JW, Sun Z, Wang MX, et al. Can the tumor deposits be counted as metastatic lymph nodes in the UICC TNM staging system for colorectal cancer? *PLoS One*. 2012;7(3):e34087.
328. Lo DS, Pollett A, Siu LL, Gallinger S, Burkes RL. Prognostic significance of mesenteric tumor nodules in patients with stage III colorectal cancer. *Cancer*. 2008;112(1):50-4.
329. Hyslop T, Waldman SA. Guanylyl cyclase C as a biomarker in colorectal cancer. *Biomark Med*. 2013;7(1):159-67.
330. Gill S, Haince JF, Shi Q, Pavey ES, Beaudry G, Sargent DJ, et al. Prognostic Value of Molecular Detection of Lymph Node Metastases After Curative Resection of Stage II Colon Cancer: A Systematic Pooled Data Analysis. *Clin Colorectal Cancer*. 2015;14(2):99-105.
331. Mescoli C, Albertoni L, Pucciarelli S, Giacomelli L, Russo VM, Fassan M, et al. Isolated tumor cells in regional lymph nodes as relapse predictors in stage I and II colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(9):965-71.
332. Rahbari NN, Bork U, Motschall E, Thorlund K, Büchler MW, Koch M, et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2012;30(1):60-70.
333. Sloothak DA, Sahami S, van der Zaag-Loonen HJ, van der Zaag ES, Tanis PJ, Bemelman WA, et al. The prognostic value of micrometastases and isolated tumour cells in histologically negative lymph nodes of patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2014;40(3):263-9.
334. Hyngstrom JR, Hu CY, Xing Y, You YN, Feig BW, Skibber JM, et al. Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the National Cancer Data Base. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(9):2814-21.
335. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):979-94.
336. Newland RC, Dent OF, Lyttle MN, Chapuis PH, Bokey EL. Pathologic determinants of survival associated with colorectal cancer with lymph node metastases. A multivariate analysis of 579 patients. *Cancer*. 1994;73(8):2076-82.
337. Liang P, Nakada I, Hong JW, Tabuchi T, Motohashi G, Takemura A, et al. Prognostic significance of immunohistochemically detected blood and lymphatic vessel invasion in colorectal carcinoma: its impact on prognosis. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(2):470-7.
338. Washington MK. Colorectal carcinoma: selected issues in pathologic examination and staging and determination of prognostic factors. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(10):1600-7.
339. Chand M, Swift RI, Tekkis PP, Chau I, Brown G. Extramural venous invasion is a potential imaging predictive biomarker of neoadjuvant treatment in rectal cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(1):19-25.
340. DUKES CE, BUSSEY HJ. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Cancer*. 1958;12(3):309-20.
341. Gabriel WB. A Small High-grade Carcinoma of the Rectum with Extensive Lymphatic Spread. *Proc R Soc Med*. 1947;40(13):833-4.
342. Yang Y, Huang X, Sun J, Gao P, Song Y, Chen X, et al. Prognostic value of perineural invasion in colorectal cancer: a meta-analysis. *J Gastrointest Surg*. 2015;19(6):1113-22.
343. Chablani P, Nguyen P, Pan X, Robinson A, Walston S, Wu C, et al. Perineural Invasion Predicts for Distant Metastasis in Locally Advanced Rectal Cancer Treated With Neoadjuvant Chemoradiation and Surgery. *Am J Clin Oncol*. 2017;40(6):561-8.
344. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*. 2009;115(15):3379-91.
345. Zlobec I, Lugli A. Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors. *World J Gastroenterol*. 2009;15(47):5898-906.
346. Koelzer VH, Lugli A. The tumor border configuration of colorectal cancer as a histomorphological prognostic indicator. *Front Oncol*. 2014;4:29.



## BIBLIOGRAFÍA

347. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol.* 2011;29(6):610-8.
348. Greenson JK, Huang SC, Herron C, Moreno V, Bonner JD, Tomsho LP, et al. Pathologic predictors of microsatellite instability in colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(1):126-33.
349. Prall F, Maletzki C, Hühns M, Krohn M, Linnebacher M. Colorectal carcinoma tumour budding and podia formation in the xenograft microenvironment. *PLoS One.* 2017;12(10):e0186271.
350. Halvorsen TB, Seim E. Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 1989;42(2):162-6.
351. Roncucci L, Fante R, Losi L, Di Gregorio C, Micheli A, Benatti P, et al. Survival for colon and rectal cancer in a population-based cancer registry. *Eur J Cancer.* 1996;32A(2):295-302.
352. Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2014;110(6):1595-605.
353. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(35):5944-51.
354. Ladoire S, Martin F, Ghiringhelli F. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(7):909-18.
355. de la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3380-7.
356. Lanza G, Gafà R, Santini A, Maestri I, Guerzoni L, Cavazzini L. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* 2006;24(15):2359-67.
357. West NP, Hohenberger W, Weber K, Perrakis A, Finan PJ, Quirke P. Complete mesocolic excision with central vascular ligation produces an oncologically superior specimen compared with standard surgery for carcinoma of the colon. *J Clin Oncol.* 2010;28(2):272-8.
358. Ang CW, Tweedle EM, Campbell F, Rooney PS. Apical node metastasis independently predicts poor survival in Dukes C colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2011;13(5):526-31.
359. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer.* 2010;46(15):2788-98.
360. Sinicrope FA, Mahoney MR, Smyrk TC, Thibodeau SN, Warren RS, Bertagnolli MM, et al. Prognostic impact of deficient DNA mismatch repair in patients with stage III colon cancer from a randomized trial of FOLFOX-based adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2013;31(29):3664-72.
361. Foltran L, De Maglio G, Pella N, Ermacora P, Aprile G, Masiero E, et al. Prognostic role of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in advanced colorectal cancer. *Future Oncol.* 2015;11(4):629-40.
362. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(9):675-84.
363. Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(10):1261-70.
364. Blons H, Emile JF, Le Malicot K, Julié C, Zaanan A, Tabernero J, et al. Prognostic value of KRAS mutations in stage III colon cancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset. *Ann Oncol.* 2014;25(12):2378-85.
365. Ogino S, Meyerhardt JA, Irahara N, Niedzwiecki D, Hollis D, Saltz LB, et al. KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res.* 2009;15(23):7322-9.

366. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(3):466-74.
367. Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, Huang TJ, Chen FM, Cheng TL, et al. Molecular detection of APC, K- ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg*. 2004;28(7):721-6.
368. Sridhar SS, Hedley D, Siu LL. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(4):677-85.
369. French AJ, Sargent DJ, Burgart LJ, Foster NR, Kabat BF, Goldberg R, et al. Prognostic significance of defective mismatch repair and BRAF V600E in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(11):3408-15.
370. Gonsalves WI, Mahoney MR, Sargent DJ, Nelson GD, Alberts SR, Sinicrope FA, et al. Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(7).
371. Millis SZ, Ikeda S, Reddy S, Gatalica Z, Kurzrock R. Landscape of Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway Alterations Across 19 784 Diverse Solid Tumors. *JAMA Oncol*. 2016;2(12):1565-73.
372. Mei ZB, Duan CY, Li CB, Cui L, Ogino S. Prognostic role of tumor PIK3CA mutation in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2016;27(10):1836-48.
373. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H, et al. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum*. 2010;53(1):57-64.
374. Missiaglia E, Jacobs B, D'Ario G, Di Narzo AF, Sonesson C, Budinska E, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Ann Oncol*. 2014;25(10):1995-2001.
375. Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer*. 2002;101(5):403-8.
376. Network CGA. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7.
377. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, LoConte N, Kennedy G, et al. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data. *J Clin Oncol*. 2011;29(33):4401-9.
378. Raghav KP, Shetty AV, Kazmi SM, Zhang N, Morris J, Taggart M, et al. Impact of molecular alterations and targeted therapy in appendiceal adenocarcinomas. *Oncologist*. 2013;18(12):1270-7.
379. Venook AP. Metastatic Colorectal Cancer: Lessons Learned, Future Possibilities. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14(5 Suppl):666-8.
380. Brulé SY, Jonker DJ, Karapetis CS, O'Callaghan CJ, Moore MJ, Wong R, et al. Location of colon cancer (right-sided versus left-sided) as a prognostic factor and a predictor of benefit from cetuximab in NCIC CO.17. *Eur J Cancer*. 2015;51(11):1405-14.
381. Fu M, Tam PK, Sham MH, Lui VC. Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study. *Anat Embryol (Berl)*. 2004;208(1):33-41.
382. Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K, Jenkins J, Cliatt J, Humbyrd CJ, et al. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12(8):755-62.
383. Menigatti M, Truninger K, Gebbers JO, Marbet U, Marra G, Schär P. Normal colorectal mucosa exhibits sex- and segment-specific susceptibility to DNA methylation at the hMLH1 and MGMT promoters. *Oncogene*. 2009;28(6):899-909.
384. Gupta S, Balasubramanian BA, Fu T, Genta RM, Rockey DC, Lash R. Polyps with advanced neoplasia are smaller in the right than in the left colon: implications for colorectal cancer screening. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(12):1395-401.e2.
385. Nishihara R, Wu K, Lochhead P, Morikawa T, Liao X, Qian ZR, et al. Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy. *N Engl J Med*. 2013;369(12):1095-105.

## BIBLIOGRAFÍA

386. Cheng YW, Pincas H, Bacolod MD, Schemmann G, Giardina SF, Huang J, et al. CpG island methylator phenotype associates with low-degree chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(19):6005-13.
387. Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, Inoue T, Hamilton C, Niedzwiecki D, et al. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2007;132(1):127-38.
388. Lee MS, McGuffey EJ, Morris JS, Manyam G, Baladandayuthapani V, Wei W, et al. Association of CpG island methylator phenotype and EREG/AREG methylation and expression in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2016;114(12):1352-61.
389. Cha Y, Kim KJ, Han SW, Rhee YY, Bae JM, Wen X, et al. Adverse prognostic impact of the CpG island methylator phenotype in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2016;115(2):164-71.
390. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2005;23(3):609-18.
391. Koopman M, Kortman GA, Mekenkamp L, Ligtenberg MJ, Hoogerbrugge N, Antonini NF, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2009;100(2):266-73.
392. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2509-20.
393. Schell MJ, Yang M, Teer JK, Lo FY, Madan A, Coppola D, et al. A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC. *Nat Commun.* 2016;7:11743.
394. Roepman P, Schlicker A, Tabernero J, Majewski I, Tian S, Moreno V, et al. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int J Cancer.* 2014;134(3):552-62.
395. Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, Van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J, et al. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2009;27(30):5068-74.
396. Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? *Ann Surg Oncol.* 2008;15(9):2388-94.
397. Loupakis F, Yang D, Yau L, Feng S, Cremolini C, Zhang W, et al. Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(3).
398. Moretto R, Cremolini C, Rossini D, Pietrantonio F, Battaglin F, Mennitto A, et al. Location of Primary Tumor and Benefit From Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies in Patients With RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist.* 2016;21(8):988-94.
399. Venook AP, Blanke CD, Niedzwiecki D, Lenz HJ, Taylor JR, Hollis DR, et al. Cancer and Leukemia Group B/Southwest Oncology Group trial 80405: a phase III trial of chemotherapy and biologics for patients with untreated advanced colorectal adenocarcinoma. *Clin Colorectal Cancer.* 2005;5(4):292-4.
400. Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F, Tabernero J, Van Cutsem E, Beier F, et al. Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials. *JAMA Oncol.* 2016.
401. Oosterhoff M, van der Maas ME, Steuten LM. A Systematic Review of Health Economic Evaluations of Diagnostic Biomarkers. *Appl Health Econ Health Policy.* 2016;14(1):51-65.
402. Djalalov S, Musa Z, Mendelson M, Siminovitch K, Hoch J. A review of economic evaluations of genetic testing services and interventions (2004-2009). *Genet Med.* 2011;13(2):89-94.
403. Gould-Suarez M, El-Serag HB, Musher B, Franco LM, Chen GJ. Cost-effectiveness and diagnostic effectiveness analyses of multiple algorithms for the diagnosis of Lynch syndrome. *Dig Dis Sci.* 2014;59(12):2913-26.
404. Behl AS, Goddard KA, Flottemesch TJ, Veenstra D, Meenan RT, Lin JS, et al. Cost-effectiveness analysis of screening for KRAS and BRAF mutations in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(23):1785-95.

405. Blank PR, Moch H, Szucs TD, Schwenkglenks M. KRAS and BRAF mutation analysis in metastatic colorectal cancer: a cost-effectiveness analysis from a Swiss perspective. *Clin Cancer Res.* 2011;17(19):6338-46.
406. Vijayaraghavan A, Efrusy MB, Göke B, Kirchner T, Santas CC, Goldberg RM. Cost-effectiveness of KRAS testing in metastatic colorectal cancer patients in the United States and Germany. *Int J Cancer.* 2012;131(2):438-45.
407. Barone C, Pinto C, Normanno N, Capussotti L, Cognetti F, Falcone A, et al. KRAS early testing: consensus initiative and cost-effectiveness evaluation for metastatic colorectal patients in an Italian setting. *PLoS One.* 2014;9(1):e85897.
408. Westwood M, van Asselt T, Ramaekers B, Whiting P, Joore M, Armstrong N, et al. KRAS mutation testing of tumours in adults with metastatic colorectal cancer: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess.* 2014;18(62):1-132.
409. Hughesman CB, Lu XJ, Liu KY, Zhu Y, Poh CF, Haynes C. A Robust Protocol for Using Multiplexed Droplet Digital PCR to Quantify Somatic Copy Number Alterations in Clinical Tissue Specimens. *PLoS One.* 2016;11(8):e0161274.
410. Lu XJD, Liu KYP, Zhu YS, Cui C, Poh CF. Using ddPCR to assess the DNA yield of FFPE samples. *Biomol Detect Quantif.* 2018;16:5-11.
411. Kang Q, Parkin B, Giraldez MD, Tewari M. Mutant DNA quantification by digital PCR can be confounded by heating during DNA fragmentation. *Biotechniques.* 2016;60(4):175-6, 8, 80 passim.
412. Demeke T, Dobnik D. Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem.* 2018;410(17):4039-50.
413. Bigagli E, De Filippo C, Castagnini C, Toti S, Acquadro F, Giudici F, et al. DNA copy number alterations, gene expression changes and disease-free survival in patients with colorectal cancer: a 10 year follow-up. *Cell Oncol (Dordr).* 2016;39(6):545-58.
414. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(7):489-99.
415. Zlobec I, Kovac M, Erzberger P, Molinari F, Bihl MP, Ruffle A, et al. Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010;127(11):2569-75.
416. Zhang Y, Suehiro Y, Shindo Y, Sakai K, Hazama S, Higaki S, et al. Long-fragment DNA as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2015;9(1):454-8.
417. Armengol G, Sarhadi VK, Ghanbari R, Doghaei-Moghaddam M, Ansari R, Sotoudeh M, et al. Driver Gene Mutations in Stools of Colorectal Carcinoma Patients Detected by Targeted Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn.* 2016;18(4):471-9.
418. Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology.* 2000;119(5):1219-27.
419. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med.* 2014;370(14):1287-97.
420. Heigh RI, Yab TC, Taylor WR, Hussain FT, Smyrk TC, Mahoney DW, et al. Detection of colorectal serrated polyps by stool DNA testing: comparison with fecal immunochemical testing for occult blood (FIT). *PLoS One.* 2014;9(1):e85659.
421. Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP, et al. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology.* 2008;135(2):489-98.
422. Sanmamed MF, Fernández-Landázuri S, Rodríguez C, Zárate R, Lozano MD, Zubiri L, et al. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin Chem.* 2015;61(1):297-304.
423. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O'Connell A, Messineo MM, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res.* 2014;20(6):1698-705.

## BIBLIOGRAFÍA

424. Chen S, Zhao J, Cui L, Liu Y. Urinary circulating DNA detection for dynamic tracking of EGFR mutations for NSCLC patients treated with EGFR-TKIs. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(3):332-40.
425. Birkenkamp-Demtröder K, Nordentoft I, Christensen E, Høyer S, Reinert T, Vang S, et al. Genomic Alterations in Liquid Biopsies from Patients with Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2016;70(1):75-82.
426. Azuara D, Ginesta MM, Gausachs M, Rodriguez-Moranta F, Fabregat J, Busquets J, et al. Nanofluidic digital PCR for KRAS mutation detection and quantification in gastrointestinal cancer. *Clin Chem*. 2012;58(9):1332-41.
427. Janku F, Angenendt P, Tsimberidou AM, Fu S, Naing A, Falchook GS, et al. Actionable mutations in plasma cell-free DNA in patients with advanced cancers referred for experimental targeted therapies. *Oncotarget*. 2015;6(14):12809-21.
428. Tabernero J, Lenz HJ, Siena S, Sobrero A, Falcone A, Ychou M, et al. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(8):937-48.
429. Chang YS, Er TK, Lu HC, Yeh KT, Chang JG. Detection of KRAS codon 12 and 13 mutations by mutant-enriched PCR assay. *Clin Chim Acta*. 2014;436:169-75.
430. Laurent-Puig P, Pekin D, Normand C, Kotsopoulos SK, Nizard P, Perez-Toralla K, et al. Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res*. 2015;21(5):1087-97.
431. Olmedillas López S, García-Olmo DC, García-Arranz M, Guadalajara H, Pastor C, García-Olmo D. KRAS G12V Mutation Detection by Droplet Digital PCR in Circulating Cell-Free DNA of Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4):484.
432. Zou H, Taylor WR, Harrington JJ, Hussain FT, Cao X, Loprinzi CL, et al. High detection rates of colorectal neoplasia by stool DNA testing with a novel digital melt curve assay. *Gastroenterology*. 2009;136(2):459-70.
433. Qi Z, Ma Y, Deng L, Wu H, Zhou G, Kajiyama T, et al. Digital analysis of the expression levels of multiple colorectal cancer-related genes by multiplexed digital-PCR coupled with hydrogel bead-array. *Analyst*. 2011;136(11):2252-9.
434. Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, Le Corre D, Mazutis L, Salem CB, et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip*. 2011;11(13):2156-66.
435. Deng L, Qi Z, Zou B, Wu H, Huang H, Kajiyama T, et al. Digital detection of multiple minority mutants in stool DNA for noninvasive colorectal cancer diagnosis. *Anal Chem*. 2012;84(13):5645-52.
436. Huang H, Li S, Sun L, Zhou G. Digital detection of multiple minority mutants and expression levels of multiple colorectal cancer-related genes using digital-PCR coupled with bead-array. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123420.
437. Mukaide M, Sugiyama M, Korenaga M, Murata K, Kanto T, Masaki N, et al. High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70. *J Virol Methods*. 2014;207:169-77.
438. Iker BC, Bright KR, Pepper IL, Gerba CP, Kitajima M. Evaluation of commercial kits for the extraction and purification of viral nucleic acids from environmental and fecal samples. *J Virol Methods*. 2013;191(1):24-30.

## **ANEXO**



# World Journal of Gastroenterology

Submit a Manuscript: <http://www.f6publishing.com>

World J Gastroenterol 2017 October 21; 23(39): 7087-7097

DOI: 10.3748/wjg.v23.i39.7087

ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)

## ORIGINAL ARTICLE

## Basic Study

## Detection of *KRAS* G12D in colorectal cancer stool by droplet digital PCR

Susana Olmedillas-López, Dennis César Lévano-Linares, Carmen Laura Aúz Alexandre, Luz Vega-Clemente, Edurne León Sánchez, Alejandro Villagrasa, Jaime Ruiz-Tovar, Mariano García-Arranz, Damián García-Olmo

Susana Olmedillas-López, Luz Vega-Clemente, Alejandro Villagrasa, Mariano García-Arranz, Damián García-Olmo, Fundación Health Research Institute-Fundación Jiménez Díaz University Hospital, Madrid 28040, Spain

Dennis César Lévano-Linares, Mariano García-Arranz, Damián García-Olmo, Department of Surgery, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 28029, Spain

Dennis César Lévano-Linares, Jaime Ruiz-Tovar, Department of Surgery, Rey Juan Carlos University Hospital, Madrid 28933, Spain

Carmen Laura Aúz Alexandre, Department of Pathology, Fundación Jiménez Díaz University Hospital, Madrid 28040, Spain

Edurne León Sánchez, Department of Biomedicine and Biotechnology, Universidad de Alcalá, Madrid 28805, Spain

Damián García-Olmo, Department of Surgery, Fundación Jiménez Díaz University Hospital, Madrid 28040, Spain

ORCID number: Susana Olmedillas-López (0000-0002-6535-5852); Dennis César Lévano-Linares (0000-0003-3027-4005); Carmen Laura Aúz Alexandre (0000-0001-5045-1326); Luz Vega-Clemente (0000-0002-8558-1937); Edurne León Sánchez (0000-0002-8279-4881); Alejandro Villagrasa (0000-0002-2683-4738); Jaime Ruiz-Tovar (0000-0002-8505-2605); Mariano García-Arranz (0000-0002-6266-9055); Damián García-Olmo (0000-0002-9369-2338).

**Author contributions:** Olmedillas-López S and Lévano-Linares DC contributed equally to this work; Olmedillas-López S, Lévano-Linares DC, García-Arranz M and García-Olmo D conceived and designed the experiments; Olmedillas-López S, Aúz Alexandre CL, Vega-Clemente L, León Sánchez E and Villagrasa A performed the experiments; Olmedillas-López S, Lévano-Linares DC, Ruiz-Tovar J, García-Arranz M and García-Olmo D analyzed the data; Olmedillas-López S and Lévano-Linares DC wrote the paper.

Supported by "Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS)-FEDER", Ministry of Health, Spain, No. PI13/01924 to García-Olmo D; and RETIC Program of ISCIII-FEDER, No. RD12/0019/0035 to Olmedillas-López S.

**Institutional review board statement:** This study was reviewed and approved by the Institutional Ethics Committee for Clinical Research of the Fundación Jiménez Díaz University Hospital (FJD) (PIC 63/2016\_FJD).

**Conflict-of-interest statement:** The authors have no conflict of interest to declare.

**Data sharing statement:** Individual participant consent was not obtained for data sharing but the presented data are anonymized and there is no possibility of identification. No additional data are available.

**Open-Access:** This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**Manuscript source:** Invited manuscript

**Correspondence to:** Susana Olmedillas-López, PhD, Postdoc Researcher, Fundación Health Research Institute-Fundación Jiménez Díaz University Hospital, Avda. Reyes Católicos 2, Madrid 28040, Spain. [susana.olmedillas@fjd.es](mailto:susana.olmedillas@fjd.es)  
Telephone: +34-91-5504800-2781  
Fax: +34-91-5505353

**Received:** June 28, 2017

**Peer-review started:** June 28, 2017

**First decision:** August 15, 2017

**Revised:** September 15, 2017

**Accepted:** September 26, 2017



Article in press: September 26, 2017  
Published online: October 21, 2017

## Abstract

### AIM

To assess *KRAS* G12D mutation detection by droplet digital PCR (ddPCR) in stool-derived DNA from colorectal cancer (CRC) patients.

### METHODS

In this study, tumor tissue and stool samples were collected from 70 patients with stage I-IV CRC diagnosed by preoperative biopsy. *KRAS* mutational status was determined by pyrosequencing analysis of DNA obtained from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor tissues. The *KRAS* G12D mutation was then analyzed by ddPCR in FFPE tumors and stool-derived DNA from patients with this point mutation. Wild-type (WT) tumors, as determined by pyrosequencing, were included as controls; analysis of FFPE tissue and stool-derived DNA by ddPCR was performed for these patients as well.

### RESULTS

Among the total 70 patients included, *KRAS* mutations were detected by pyrosequencing in 32 (45.71%), whereas 38 (54.29%) had WT tumors. The frequency of *KRAS* mutations was higher in left-sided tumors (11 located in the right colon, 15 in the left, and 6 in the rectum). The predominant point mutation was *KRAS* G12D (14.29%,  $n = 10$ ), which was more frequent in early-stage tumors (I-IIA,  $n = 7$ ). In agreement with pyrosequencing results, the *KRAS* G12D mutation was detected by ddPCR in FFPE tumor-derived DNA, and only a residual number of mutated copies was found in WT controls. The *KRAS* G12D mutation was also detected in stool-derived DNA in 80% of all fecal samples from CRC patients with this point mutation.

### CONCLUSION

ddPCR is a reliable and sensitive method to analyze *KRAS* G12D mutation in stool-derived DNA from CRC patients, especially at early stages. This non-invasive approach is potentially applicable to other relevant biomarkers for CRC management.

**Key words:** Droplet digital PCR; *KRAS*; Stool; Formalin-fixed paraffin-embedded; Pyrosequencing; Colorectal cancer

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Core tip:** The potential of droplet digital PCR (ddPCR) to detect *KRAS* G12D mutation in stool DNA from colorectal cancer (CRC) patients was examined as a proof-of-concept for the applicability of this technology to study DNA biomarkers in stool-derived DNA. It was

shown that *KRAS* G12D detection in stool-derived DNA from CRC patients by ddPCR is feasible and provides comparable results to the analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue by pyrosequencing. These results suggest that analysis of *KRAS* mutations and other molecular biomarkers in stool by ddPCR could represent a complementary non-invasive approach to standard screening tests for CRC.

Olmedillas-López S, Lévano-Linares DC, Aúz Alexandre CL, Vega-Clemente L, León Sánchez E, Villagrasa A, Ruiz-Tovar J, García-Arranz M, García-Olmo D. Detection of *KRAS* G12D in colorectal cancer stool by droplet digital PCR. *World J Gastroenterol* 2017; 23(39): 7087-7097. Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v23/i39/7087.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i39.7087>

## INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the second and third most common cancer in women and men, respectively, with more than one million cases diagnosed each year worldwide<sup>[1]</sup>. Current therapeutic options have increased overall survival (OS), but have also made clinical decisions more complex, especially in patients with an initial diagnosis of metastatic colorectal cancer (mCRC)<sup>[2]</sup>. Biological agents targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR), such as cetuximab and panitumumab, used either as monotherapy or in combination with standard chemotherapy, are indicated in mCRC patients with *RAS* (*KRAS* and *NRAS*) or *KRAS* wild-type (WT) tumors, respectively<sup>[3,4]</sup>. These strategies significantly improve progression-free survival (PFS) and OS in *KRAS* WT mCRC patients depending on the therapeutic regimen applied (chemotherapy and line of treatment)<sup>[2,5]</sup>.

*KRAS* oncogene mutations, mostly found in codons 12 and 13<sup>[6]</sup>, have been described in approximately 30%-40% of CRC tumors<sup>[7-9]</sup>. These mutations are associated with absence of response to therapy with biological agents<sup>[10,11]</sup> and have been correlated with worse prognosis<sup>[12,13]</sup>. In fact, in Europe and the United States, monoclonal antibody-based therapy has been restricted to patients with WT tumors<sup>[14]</sup>, as when administered in association with standard chemotherapy, this treatment may result in an increased cost and toxicity<sup>[10]</sup>. Drug resistance can occur months after start of combined therapy, likely due to intratumoral heterogeneity and proliferation of small sub-groups of clonal cells carrying resistance mutations that are difficult to identify by most of the currently applied methods<sup>[14,15]</sup>. Therefore, highly sensitive and specific methodologies are needed to detect and quantify molecular markers, including *KRAS* mutations, which play a pivotal role in early detection and clinical management of CRC patients.



Droplet digital PCR (ddPCR) is increasingly seen as one of the most powerful techniques to accurately detect a wide variety of genetic alterations in many cancer types. These molecular biomarkers have been analyzed by ddPCR in different body fluids such as blood, urine, cerebrospinal fluid, pleural effusions, ascites and sputum (reviewed in<sup>[16]</sup>).

Stool-derived DNA is a potential non-invasive alternative source of DNA for tumor genotyping in CRC due to the high rate of exfoliation of tumor cells into the bowel lumen<sup>[17]</sup>. Digital PCR was first described in 1999 by Vogelstein and Kinzler in a study aimed at identifying *KRAS* in DNA obtained from fecal samples of CRC patients<sup>[18]</sup>. Based on the isolation of single molecules by limiting dilution of DNA samples and individual amplification by PCR, mutations were detected using fluorescent probes. However, this methodology was found to be quite laborious and difficult to translate into clinical practice<sup>[19]</sup>. The introduction of new instrumentation involving nanofluidic devices and improved emulsion chemistries has allowed for more widespread use of digital PCR, giving way to the current commercially available platforms<sup>[19]</sup>; of these, emulsion-based ddPCR has undergone huge growth in cancer research. In fact, a recent study has investigated the application of ddPCR to quantify mRNA biomarkers in stool from patients with CRC as a potential non-invasive screening test<sup>[17]</sup>. Thus, analysis of DNA obtained from fecal samples in patients with CRC may complement currently used procedures for diagnosis and disease follow-up.

In our experience, ddPCR has shown high sensitivity for detection of mutated *KRAS* alleles in circulating cell-free DNA (cfDNA) in plasma from CRC patients<sup>[20]</sup>. However, early-stage patients sometimes have undetectable levels of circulating tumor DNA (ctDNA)<sup>[20,21]</sup>. The aim of this study was to evaluate the feasibility of *KRAS* G12D mutation detection in stool-derived DNA from CRC patients by ddPCR, including early-stage patients.

## MATERIALS AND METHODS

### *Patients*

Seventy CRC patients were consecutively included in this study from 2014 to 2015 in the Department of General Surgery at Fundación Jiménez Díaz University Hospital (Madrid, Spain). Inclusion criteria were endoscopic histological diagnosis of CRC and eligibility for primary tumor resection with curative intent. Patients with primary tumors located in the rectum who had received prior neoadjuvant treatment were excluded. All subjects signed an informed consent in accordance with a protocol approved by the Ethics Committee for Clinical Research of this institution (PIC 63/2016\_FJD).

### *Fecal sample collection*

All fecal samples were collected during hospitalization before surgery without any bowel preparation (with the exception of patient 17, who was subjected to cathartic preparation due to an oversight). Stool samples were collected in sterile containers and stored at -20 °C until analysis.

### *DNA extraction*

A total amount of 200-500 mg of fecal sample was used for DNA extraction. DNA was isolated using the QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA from the LS-174T cell line (kindly provided by the Translational Oncology Division, OncoHealth Institute, IIS-FJD, which had previously purchased this cell line from the American Type Culture Collection, ATCC in Manassas, VA, United States) and DNA from peripheral blood mononuclear cells of a healthy donor were extracted with the QIAamp DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. DNA from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumors was extracted using the Cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, United States) following the manufacturer's instructions. The quantity and purity of the DNA obtained was estimated by NanoDrop (ND-2000 UV-Vis Spectrophotometer; Nanodrop Technologies Inc., Waltham, MA, United States).

### *Mutation detection in FFPE tumor samples by pyrosequencing*

Quantitative analysis of *KRAS* mutations was performed by pyrosequencing in accordance with routine practice at the Department of Pathology at Fundación Jiménez Díaz University Hospital, using the CE-IVD marked Therascreen *KRAS* Pyro kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocols. Each PCR product was analyzed by pyrosequencing using the Therascreen *KRAS* Pyro reagents (Qiagen), Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden), and a PyroMark Q24 instrument (Qiagen).

### *Mutation detection in FFPE tumor tissues and stool samples by ddPCR*

ddPCR assays were performed using the QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) with the Prime-PCR™ ddPCR™ Mutation Detection Assay Kit (Bio-Rad); amplicon size was 57 bp. DNA from LS-174T, a human colon adenocarcinoma *KRAS* G12D heterozygous cell line, was used as a positive control. *KRAS* WT control DNA was obtained from peripheral blood mononuclear cells of a healthy donor. Background was measured by adding water to the reaction mixture instead of

DNA. The PCR reaction mixture (20  $\mu$ L) contained 10  $\mu$ L of ddPCR Supermix (no dUTP) for probes, 1  $\mu$ L of each primer/probe mix (target and reference, labeled with HEX and FAM fluorophores, respectively), and 2-8  $\mu$ L of stool-extracted DNA. Different amounts of stool-derived DNA were assayed per sample, as the proportion of human DNA with respect to bacterial DNA was unknown and could vary among patients. A total amount of 100 ng of cell-derived control DNA was added per well. In case of DNA from FFPE tumors, 50 ng per well was used. Thermal cycling consisted of 10 min at 95 °C, 40 cycles of 94 °C for 30 s, and 55 °C for 60 s. Results were analyzed using QuantaSoft v.1.7 software (Bio-Rad) and reported as number of copies per 20  $\mu$ L reaction as well as copies per ng of DNA. Three to four replicates of each stool sample were analyzed. FFPE tumors and controls were assayed in duplicate.

#### Statistical analysis

A non-parametric Mann-Whitney test for significance was performed using R software.

## RESULTS

#### Patient characteristics

A total of 70 stool and tissue samples from CRC patients were collected and included in the study. All patients were classified according to the distance between the primary tumor and anal margin (cm) reported in the preoperative colonoscopy. Forty-one (58.57%) were male, with a median age of 73 years. Only 5 (7.14%) had a diagnosis of mCRC at baseline.

The patients included in this study were representative of all tumor locations, with 28 (40%) located in the right colon, 34 (48.57%) in the left colon, and 8 (11.43%) in the rectum. Interestingly, 45 (64.29%) patients were diagnosed at an early stage (I-IIA). Clinical and pathological features are summarized in Table 1.

#### KRAS mutations in FFPE tumor samples analyzed by pyrosequencing

KRAS mutations were found in the tumors of 32 patients (45.71%), including 11 in the right colon, 15 in the left, and 6 in the rectum. Most mutations were located at codon 12 ( $n = 17$ , 53.12%) or codon 13 ( $n = 6$ , 18.75%). The most prevalent mutation was G12D ( $n = 10$ , 14.29%). Two were located in the right colon, 6 in the left colon, and 2 in the rectum. This mutation was found more frequently in early-stage tumors (I-IIA,  $n = 7$ ). The incidence of the different types of mutations is shown in Table 2.

#### KRAS G12D detection in FFPE tumor samples by ddPCR

FFPE tumors from patients found to have a KRAS G12D mutation by pyrosequencing were analyzed

using ddPCR. Five CRC patients with WT KRAS exon 2 tumors were selected as controls. One control carried a KRAS Q61L mutation (exon 3) that did not interfere with our assays. Results obtained from ddPCR analysis of FFPE tumor DNA from these 15 CRC patients were in agreement with pyrosequencing results. A residual number of KRAS G12D copies was found in WT tumors. Due to this level of unspecific background signal, mean copies/ng DNA from control patients plus 2 standard deviation (SD) was considered as a threshold for positivity (0.41 copies/ng DNA). All samples from patients with G12D-positive tumors were above this threshold and showed a significantly higher number of mutant copies/ng DNA than patients with WT KRAS tumors (median, 106 and 0.19 copies/ng DNA, respectively;  $P = 0.001$ ). However, the difference in number of WT KRAS copies/ng DNA between both groups was not statistically significant (210.00 copies/ng vs 208.40 copies/ng DNA, median;  $P = 0.699$ ).

#### KRAS G12D detection in stool samples by ddPCR

Subsequently, we analyzed the presence of the KRAS G12D mutation by ddPCR analysis of fecal samples from the 10 patients with mutated tumors by pyrosequencing. Stool DNA from 5 patients with tumors carrying the WT KRAS exon 2 were also included as controls. A limited number of KRAS G12D-positive events were detected in stool DNA from control WT KRAS exon 2 samples. Consequently, mean control value plus 2 SD was established as the positivity threshold. Thus, in our study, stool samples were required to contain more than 1.9 copies/20  $\mu$ L of reaction to be considered positive for the mutation. According to this threshold, which was equivalent to  $> 3$  positive events per sample, the KRAS G12D mutation was detected in 8 of 10 patients. Of these 8 positive samples, 6 were from early-stage tumors. Samples from Patients 46 and 64 were considered negative because they had values less than or equal to the positivity threshold. KRAS G12D mutation levels in stool samples are shown in Tables 3 and 4. The median number of copies of KRAS G12D/20  $\mu$ L of reaction as well as copies/ng of stool DNA in control patients differed significantly from those with mutated tumors ( $P = 0.017$ ). The KRAS WT sequence was also detected in stool samples of all CRC patients, though there were no significant differences in the median number of KRAS WT copies/ng of stool DNA between both groups ( $P = 0.129$ ).

In summary, the results of pyrosequencing were in 100% agreement with ddPCR analysis in FFPE tissues, whereas ddPCR detected the KRAS mutation in 8 out of 10 stool samples.

## DISCUSSION

Despite the advances made in CRC research, the



Table 1 Patient characteristics

		Colorectal cancer patients, n = 70		
		Right colon, n = 28	Left colon, n = 34	Rectum, n = 8
Sex	Female	13	13	3
	Male	15	21	5
Age (mean)		76.89	72.26	70.63
pT	T1	3	4	2
	T2	6	9	2
	T3	16	18	3
	T4	3	3	1
pN	N0	20	22	8
	N+	8	12	-
Stage	I	9	10	4
	IIa	9	10	3
	IIb	1	1	1
	IIIa	1	3	-
	IIIb	4	5	-
	IIIc	2	2	-
	IV	2	3	-
KRAS status	Mutant	11	15	6
	Wild-type	17	19	2

disease remains a major cause of death worldwide. Recently, the analysis of *KRAS* oncogene mutations has taken on a major prognostic role in CRC clinical management<sup>[22]</sup> owing to the fact that the presence of these mutations, which have been described in approximately 30%-40% of cases<sup>[7,9,23]</sup>, could determine the absence of response to anti-EGFR therapies and worse outcome in cases of metastatic disease<sup>[10-13]</sup>. The most frequent *KRAS* mutations are located at codons 12 and 13; of these, G12D and G13D are particularly relevant, representing around 13%-14% and 6%-7% of all cases, respectively<sup>[7,23]</sup>. Moreover, worse prognosis has been documented among patients with tumors with the G12D mutation<sup>[8,23]</sup>. In agreement with previous observations, the incidence of *KRAS* G12D mutation in our study population was 14.29%.

Molecular biomarkers in blood and stool may be used as a complementary screening strategy and prognostic tool for the prediction of clinical outcome in patients with or at high risk for CRC<sup>[24]</sup>. Not only in CRC, but also in many other human malignancies, the analysis of molecular biomarkers in plasma and other body fluids is attracting increasing interest as a highly valuable, non-invasive predictive tool for monitoring disease progression and response to treatment<sup>[16]</sup>. In CRC, *KRAS* mutations have been analyzed in blood, both in DNA obtained from circulating tumor cells<sup>[25]</sup> and in cfDNA<sup>[26]</sup>. *KRAS*-mutation detection by digital PCR has been described using several commercially available platforms<sup>[14,27-32]</sup>, most of which are focused on detecting mutations in plasma. One of these strategies is ddPCR, which has shown a remarkably

high sensitivity when detecting these minority *KRAS* alleles present at low levels in plasma DNA.

In a previous study, using ddPCR, we detected the *KRAS* G12V mutation in plasma cfDNA from 9 of 10 patients whose tumors were also mutated<sup>[20]</sup>. In this study, we found that metastatic patients had a significantly higher number of mutated copies in circulating cfDNA than M0 patients. The only negative sample was obtained from a T1N0M0 patient. These results are in line with other studies: Bettegowda *et al*<sup>[21]</sup> also reported that ctDNA in plasma increases with disease stage, and only 47% of early-stage patients with a wide variety of cancers had detectable levels of ctDNA. Similarly, Galanopoulos *et al*<sup>[26]</sup> recently described that the *KRAS* codon 12 mutation rate in cfDNA is significantly higher in CRC patients compared to healthy subjects, though this methodology seems to have limited potential for predicting the existence of premalignant lesions (neoplastic colonic polyps). Taken together, these findings suggest that at early disease stages, levels of mutated copies in circulating cfDNA may be, in some cases, too low for detection. Thus, alternative non-invasive methods are still needed.

Interestingly, in a very recent study, ddPCR was also used to quantify an mRNA biomarker, *ITGA6*, in stool from patients with CRC<sup>[17]</sup>. Tumor-derived nucleic acids present in stool samples come from the exfoliation of tumor cells of the intestinal mucosa and are a non-invasive, alternative source of genetic material for *KRAS* oncogene mutation screening in CRC patients<sup>[33]</sup>. Exfoliation of colonocytes into the large bowel lumen is a continuous, naturally-occurring phenomenon that seems to be exacerbated in tumors<sup>[34,35]</sup>. Thus, colonocyte shedding from malignant lesions is more frequent than from healthy mucosa<sup>[36,37]</sup>. Hypothetically, DNA from colorectal tumors should be shed into the bowel fecal content before reaching the bloodstream. This would make testing stool DNA for CRC screening more time-sensitive than plasma or other biological fluids<sup>[38]</sup>.

The proof-of-concept study for stool DNA analysis for CRC detection screened 15 point mutations in several genes, including *KRAS*<sup>[39]</sup>. Subsequently, several case-control and prospective studies<sup>[40-42]</sup> led to the 2014 approval by the United States Food and Drug Administration of a fecal DNA analysis system called Cologuard<sup>™</sup> (Exact Sciences Corporation, Madison, WI, United States) for CRC detection. This system includes an immunochemical assay for human hemoglobin and molecular biomarkers associated with CRC, such as methylation markers (*BMP3* and *NFRG4* gene promoter regions), *KRAS* mutations, and  $\beta$ -actin. The test is based on amplification and detection by Quantitative Allele-specific Real-time Target and Signal

Table 2 *KRAS* mutational status by pyrosequencing

<i>KRAS</i> wild-type		<i>KRAS</i> mutations											
		Codon 12				Codon 13		Others					
		G12D	G12V	G12R	G12S	G13D	G13R	A146V	A146T	A59T	Q61R	Q61H	Q61L
Right colon	17	2	0	1	0	3	1	1	1	0	1	1	0
Left colon	19	6	5	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
Rectum	2	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1
		10	5	1	1	5	1	2	2	1	1	2	1
Total	38 (54.29%)	32 (45.71%)											

Amplification (QuARTS™) technology. However, this system still has limited application in clinical practice due to its elevated cost. Additionally, the technical difficulties of this test include the need for a large volume of stool sample and the high rate of false-positive results, creating a need for more confirmative colonoscopies and additional costs<sup>[38]</sup>. Further studies evaluating the cost-effectiveness of this test for large-scale population screening are needed<sup>[43]</sup>.

Fecal DNA analysis for mutation detection has also been reported using several digital PCR systems<sup>[18,27,44-48]</sup>, the first of which were the studies carried out by Vogelstein and Kinzler<sup>[18,44]</sup>, which led to the development of BEAMing (named for 'beads, emulsions, amplification, and magnetics')<sup>[27]</sup>. Other examples are target-enriched multiplex PCR (Tem-PCR)<sup>[47]</sup>, MDHB (multiplex digital PCR coupled with hydrogel bead-array)<sup>[46]</sup>, and MLPA-DABA (multiplex ligation-dependent probe amplification-digital amplification coupled with hydrogel bead-array)<sup>[48]</sup>. It is worth mentioning that, to date, none of these systems has been further developed and subjected to clinical validation for stool DNA screening.

In our study, DNA from fecal samples of CRC patients was successfully obtained in all cases. Presence of the *KRAS* G12D mutation was determined by pyrosequencing of FFPE tissue as a reference standard. Results of *KRAS* G12D mutation detection in FFPE tumors using ddPCR were in total agreement with pyrosequencing analysis. This was expected, given the fact that ddPCR has been proven to achieve higher sensitivity than pyrosequencing<sup>[49]</sup>. Once the *KRAS* G12D mutation had been screened in tumor tissues, DNA from stool samples obtained from the same patients prior to surgery was also analyzed. Thus, we were able to detect the *KRAS* G12D mutation in 8 out of 10 stool samples from patients known to carry this mutation in their tumors using both methods. It is noteworthy that 6 of these 8 samples were from early-stage patients (I-IIA), highlighting the potential of this approach to identify *KRAS* mutations at the initial stages of the disease.

Absorbance at a wavelength of 230 nm has been reported as an indicator of the level of potential PCR inhibitors in fecal samples<sup>[50]</sup>, and it should be

noted that the two negative samples showed peak of absorbance at this same wavelength. Thus, the sensitivity of detection in our assay could have been greatly reduced by the presence of PCR inhibitors in these samples.

The sample from Patient 17 is noteworthy for its remarkably high concentration of both mutated and WT copies. It is worth mentioning that this patient was subjected to cathartic preparation prior to sample collection due to an oversight. The rest of the samples were collected without any bowel preparation. We hypothesize that purging could have increased the exfoliation of tumor cells into the bowel lumen. This unexpected observation raises the question of whether bowel preparation could be advisable prior to sample collection to increase the sensitivity of detection in stool screening of *KRAS* mutations by ddPCR.

To our knowledge, this is the first study to evaluate the feasibility of detection of the *KRAS* G12D mutation in stool DNA from CRC patients using this particular ddPCR platform. Our results are in line with the above-mentioned recently published study by Herring *et al.*<sup>[17]</sup>, reporting the detection and accurate quantification of an mRNA biomarker in stool from CRC patients using the same ddPCR system. In light of these results, the analysis of CRC biomarkers in stool using ddPCR merits further study in larger cohorts of patients to evaluate the clinical utility of this approach.

We analyzed only the most prevalent *KRAS* mutation (G12D) in our population, as it was the only one with a sufficient number of samples available for analysis ( $n = 10$ ). Another reason for choosing G12D as a target was that it has the highest incidence in CRC patients worldwide and is associated with poor clinical outcome<sup>[8,23]</sup>. For lower-incidence mutations, such as G12V, there were too few samples in our study population to provide conclusive results. The analysis of *KRAS* G12D performed in this study represents a proof-of-concept of the feasibility of this strategy as a first step prior to the screening of other relevant hotspot mutations.

This preliminary study demonstrates the capability of ddPCR to detect *KRAS* mutations in stool-derived DNA, acting as a complementary approach to tissue biopsy for tumor genotyping. These results pave the



Table 3 *KRAS* G12D mutation levels in DNA from stool samples of wild-type control patients

Patient	Tumor location	Tumor stage	G12D					Wild-type				
			Single			Merged		Single			Merged	
			Positive events	Copies/ $\mu$ L	Copies/20 $\mu$ L reaction	Positive events	Copies/ $\mu$ L	Copies/20 $\mu$ L reaction	Positive events	Copies/ $\mu$ L	Copies/20 $\mu$ L reaction	Copies/ng DNA
53	Left	I	1	0.1	2	3	0.07	1.40	94	9	180	1.615
			2	0.17	3.4				12	10.8	216	
			0	0	0				116	9.9	198	
56	Left	IIA	0	0	0				136	12.1	242	
			1	0.08	1.6	1	0.02	0.40	17	1.4	28	0.240
			0	0	0				25	2.1	42	
63	Right	IIA	0	0	0				16	1.3	26	
			0	0	0				18	1.4	28	
			1	0.08	1.6	1	0.02	0.42	258	20.4	408	3.123
71	Right	IIIB	0	0	0				222	22.1	442	
			0	0	0				217	19	380	
			0	0	0				260	19.9	398	
96	Left	IV	1	0.08	1.6	3	0.06	1.20	89	6.7	134	1.108
			2	0.15	3				104	7.9	158	
			0	0	0				93	6.9	138	
96	Left	IV	0	0	0				91	7.3	146	
			1	0.09	1.8	3	0.06	1.20	32	3	60	0.437
			1	0.08	1.6				33	2.6	52	
96	Left	IV	1	0.09	1.8				34	3	60	
			0	0	0				34	2.9	58	
			0	0	0							

way for the ddPCR analysis of other molecular biomarkers of CRC in stool, including other *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutations. A multiplex assay simultaneously covering all *KRAS* mutations relevant for anti-EGFR therapy decision-making would maximize the benefits and optimize the cost-effectiveness of this approach. Further studies involving larger cohorts of patients and samples collected at different time points throughout the progression of the disease should be performed in order to confirm the prognostic value and economic viability of this tool before implementation in clinical practice.

This study is the first to describe the detection of *KRAS* G12D mutation in stool-derived DNA from CRC patients using a commercially available ddPCR platform, including individuals at early stages of the disease. We hypothesized that ddPCR could be a reliable and sensitive method to analyze *KRAS* mutations in stool-derived DNA providing reproducible and accurate results. Our findings suggest this approach, which is fast, simple and affordable, could be adaptable to the detection of other clinically relevant molecular biomarkers for CRC management. These advantages with respect to other previously described stool-based strategies, together with instrumentation and protocols easily adoptable by any lab, make our approach more feasible for implementation into routine clinical practice. In light of our results, it could be proposed that biomarker analysis by ddPCR of stool samples may complement current CRC screening methods; stool-derived nucleic acid testing by ddPCR offers an alternative tool to tissue genotyping and blood-based biomarker quantification, being less invasive than the former and, probably, more time-sensitive than

Table 4 KRAS G12D mutation levels in DNA from stool samples of patients with KRAS G12D mutated tumors

Patient	Tumor location	Tumor stage	G12D						Wild-type					
			Single			Merged			single			Merged		
			Positive events	Copies/ $\mu$ L	Copies/20 $\mu$ L reaction	Positive events	Copies/ $\mu$ L	Copies/20 $\mu$ L reaction	Positive events	Copies/ $\mu$ L	Copies/20 $\mu$ L reaction	Positive events	Copies/ $\mu$ L	Copies/ng DNA
12	Rectum	I	4	0.32	6.4	14	0.37	7.40	0.051	155	252	493	13.10	262.00
			5	0.39	7.8					158	250			
			5	0.39	7.8					180	282			
17	Left	I	1147	95	1900	4849	97.20	1944.00	41.362	4684	8920	19664	456.00	9120.00
			1243	98	1960					4996	9160			194.043
			1269	99	1980					5094	9200			
			1190	97	1940					4890	9220			
29	Left	IIIB	5	0.41	8.2	11	0.30	6.00	0.024	94	154	257	7.10	142.00
			3	0.24	4.8					90	148			
			3	0.25	5					73	124			
30	Right	I	6	0.57	11.4	18	0.54	10.80	0.017	238	456	757	23.10	462.00
			7	0.64	12.8					268	496			
			5	0.43	8.6					251	436			
43	Right	IIIC	6	0.59	11.8	19	0.59	11.80	0.035	418	840	1393	44.10	882.00
			8	0.7	14					492	910			2.602
			5	0.46	9.2					483	896			
46 <sup>a</sup>	Left	IIC	1	0.09	1.8	3	0.09	1.80	0.014	81	140	265	7.80	156.00
			1	0.09	1.8					97	166			1.238
			1	0.09	1.8					87	164			
51	Rectum	I	13	1	20	47	0.90	18.00	0.295	1292	2060	5110	102.60	2052.00
			12	0.9	18					1291	2040			33.639
			9	0.68	13.6					1297	2040			
			13	1	20					1290	2060			
64 <sup>a</sup>	Left	I	0	0	0	0	0.00	0.00	0.000	141	240	653	12.20	244.00
			0	0	0					163	242			1.877
			0	0	0					154	228			
			0	0	0					195	266			
			0	0	0					2515	5640			7.656
70	Left	I	11	1.1	22	45	1.37	27.40	0.036	3313	6100	8516	294.00	5880.00
			24	1.9	38					282	544			
			10	1	20					291	5820			2.788
			0	0	0	11	0.33	6.60	0.032	304	544	964	29.00	580.00
75	Left	IIA	2	0.18	3.6					326	596			
			9	0.8	16					334	602			

<sup>a</sup>Patients 46 and 64 were considered negative because they had values less than or equal to the positivity threshold.

the later, especially at early stages, as tumor DNA will reasonably reach the fecal content more quickly than the bloodstream, at least during the initial phases of cancer development.

## ARTICLE HIGHLIGHTS

### Research background

Clinical management of colorectal cancer (CRC) requires analysis of molecular biomarkers, such as KRAS or NRAS mutations, which are associated with the emergence of resistance to therapy with biological agents. Tumor genotyping is usually performed using DNA from tissue biopsies, and, in recent years, from blood as well. However, at early disease stages, levels of mutated copies in circulating cell-free DNA may be, in some cases, too low for detection. Thus, extremely sensitive and non-invasive alternative methods are still needed to improve detection and achieve accurate quantification of these biomarkers.

### Research motivation

Stool is an alternative and non-invasive source of genetic material for tumor genotyping in CRC. To date, several strategies based on analysis of molecular markers in fecal samples have been proposed, though their application in clinical practice remains limited due to their elevated cost and reduced sensitivity at early stages of disease.

### Research objectives

The aim of this study was to assess the potential of droplet digital PCR (ddPCR) to detect the KRAS G12D mutation in stool-derived DNA from CRC patients as a proof-of-concept for the applicability of this technology as a non-invasive method of studying clinically relevant DNA biomarkers in stool.

### Research methods

KRAS mutations were determined by pyrosequencing in DNA obtained from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor tissues. Then, KRAS G12D mutation was analyzed by ddPCR in FFPE tumors and stool-derived DNA in samples obtained from patients carrying this point mutation.

### Research results

The KRAS G12D mutation was detected by ddPCR in FFPE tumor-derived DNA and in stool-derived DNA in 80% of all fecal samples from CRC patients with this mutation.

### Research conclusions

This is the first study to describe the detection of the KRAS G12D mutation in stool-derived DNA from CRC patients using a commercially available ddPCR platform, including in individuals with early stages of the disease. ddPCR served as a reliable tool for detecting this clinically relevant mutation in stool-derived DNA from CRC patients. Several stool-based strategies involving digital PCR have been investigated to analyze relevant mutations for CRC management. However, none of these approaches has been further developed and subjected to clinical validation for stool DNA screening to date.

The advantages of ddPCR technology, together with instrumentation and protocols easily adoptable by any lab, support a potential translation of this approach to clinical scenarios. Our results show that KRAS G12D detection in stool-derived DNA from CRC patients by ddPCR is feasible and suggests this technology might be useful for the analysis of other molecular markers in stool. The authors hypothesized that ddPCR could be a reliable and sensitive method of analyzing KRAS mutations in stool-derived DNA, providing reproducible and accurate results.

This study proposed a new strategy based on detecting KRAS mutations in stool-derived DNA using a commercially available ddPCR platform. ddPCR is an emulsion-based amplification technology with fluorescently labelled probes. KRAS G12D mutation detection in stool-derived DNA by ddPCR is a fast, simple, and affordable approach which could be adapted to detect other clinically relevant molecular biomarkers for CRC management. This technique is more feasible for implementation into routine clinical practice than other

previously described stool-based strategies.

ddPCR provided sensitive, accurate, and reproducible results for detection of the KRAS G12D mutation in stool-derived DNA from CRC patients, especially at early stages of the disease. In light of our results, it could be proposed that biomarker analysis by ddPCR in stool samples may complement current CRC screening methods; stool-derived nucleic acid testing by ddPCR offers an alternative to tissue genotyping and blood-based biomarker quantification, is a less invasive tool than the former and is likely more time-sensitive than the latter, especially at early stages, as tumor DNA will reasonably reach the fecal content more quickly than the bloodstream, at least during the initial phases of cancer development.

### Research perspectives

KRAS mutations are analyzable by ddPCR in stool-derived DNA from CRC patients, including early-stage patients. This observation merits further studies aimed at evaluating and improving the efficiency of this approach prior to its clinical application. These results pave the way for ddPCR analysis of other molecular biomarkers of CRC in stool. Further studies involving larger cohorts of patients and samples collected at different time points throughout the progression of the disease should be performed in order to confirm the prognostic value and economic viability of this tool before implementation in clinical practice. A multiplex assay simultaneously covering all KRAS mutations relevant for anti-EGFR-therapy decision-making would maximize the benefits and optimize the cost-effectiveness of this approach. This strategy should be further investigated as a complementary screening test for early detection of CRC.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge Dr. Federico Rojo from the Department of Pathology at Fundación Jiménez Díaz University Hospital for his collaboration in this study. The authors also acknowledge Yolanda López Revuelta and all the Nursing staff from the Department of Surgery at Fundación Jiménez Díaz University Hospital for collaborating in sample collection. The authors also acknowledge Dr. Ignacio Mahillo for statistical analysis and Oliver Shaw for his revision of the text for aspects related to the English language.

## REFERENCES

- 1 Stewart BW, Wild CP. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2014. 1 edition. Lyon, France: World Health Organization, 2014
- 2 Peeters M, Price T. Biologic therapies in the metastatic colorectal cancer treatment continuum—applying current evidence to clinical practice. *Cancer Treat Rev* 2012; 38: 397-406 [PMID: 21899955 DOI: 10.1016/j.ctrv.2011.08.002]
- 3 European Medicines Agency. Erbitux: EPAR - Product Information Last updated on 03/02/2015. [Internet]. [cited 2017 Jun 15]. Available from: URL: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000558/WC500029119.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf)
- 4 European Medicines Agency. Vectibix: EPAR - Product Information Last updated on 09/03/2017 [Internet]. [cited 2017 Jun 15]. Available from: URL: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000741/WC500047710.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000741/WC500047710.pdf)
- 5 Song QB, Wang Q, Hu WG. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 4365-4372 [PMID: 25892888 DOI: 10.3748/wjg.v21.i14.4365]
- 6 Boleij A, Tack V, Taylor A, Kafatos G, Jenkins-Anderson S, Tembuysen L, Dequeker E, van Krieken JH. RAS testing practices



- and RAS mutation prevalence among patients with metastatic colorectal cancer: results from a Europe-wide survey of pathology centres. *BMC Cancer* 2016; 16: 825 [PMID: 27784278 DOI: 10.1186/s12885-016-2810-3]
- 7 Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 2009; 205: 858-862 [PMID: 19679400 DOI: 10.1016/j.prp.2009.07.010]
  - 8 Zocche DM, Ramirez C, Fontao FM, Costa LD, Redal MA. Global impact of KRAS mutation patterns in FOLFOX treated metastatic colorectal cancer. *Front Genet* 2015; 6: 116 [PMID: 25870609 DOI: 10.3389/fgene.2015.00116]
  - 9 Modest DP, Ricard I, Heinemann V, Hegewisch-Becker S, Schmiegel W, Porschen R, Stintzing S, Graeven U, Arnold D, von Weikersthal LF, Giessen-Jung C, Stahler A, Schmoll HJ, Jung A, Kirchner T, Tannapfel A, Reinacher-Schick A. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol* 2016; 27: 1746-1753 [PMID: 27358379 DOI: 10.1093/annonc/mdw261]
  - 10 Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tamasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3992-3995 [PMID: 16618717 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0191]
  - 11 Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1626-1634 [PMID: 18316791 DOI: 10.1200/JCO.2007.14.7116]
  - 12 Andreatos N, Romekleiv-Kelly S, Margonis GA, Sasaki K, Gani F, Amini N, Wilson A, Pawlik TM. From bench to bedside: Clinical implications of KRAS status in patients with colorectal liver metastasis. *Surg Oncol* 2016; 25: 332-338 [PMID: 27566041 DOI: 10.1016/j.suronc.2016.07.002]
  - 13 Jones RP, Sutton PA, Evans JP, Clifford R, McAvoy A, Lewis J, Rousseau A, Mountford R, McWhirter D, Malik HZ. Specific mutations in KRAS codon 12 are associated with worse overall survival in patients with advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer* 2017; 116: 923-929 [PMID: 28208157 DOI: 10.1038/bjc.2017.37]
  - 14 Laurent-Puig P, Pekin D, Normand C, Kotsopoulos SK, Nizard P, Perez-Toralla K, Rowell R, Olson J, Srinivasan P, Le Corre D, Hor T, El Harrak Z, Li X, Link DR, Bouché O, Emile JF, Landi B, Boige V, Hutchison JB, Taly V. Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 1087-1097 [PMID: 25248381 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0983]
  - 15 Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS, Vogelstein B. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486: 537-540 [PMID: 22722843 DOI: 10.1038/nature11219]
  - 16 Olmedillas-López S, García-Arriaza M, García-Olmo D. Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology. *Mol Diagn Ther* 2017; Epub ahead of print [PMID: 28477149 DOI: 10.1007/s40291-017-0278-8]
  - 17 Herring E, Kanaoka S, Tremblay É, Beaulieu JF. Droplet digital PCR for quantification of ITGA6 in a stool mRNA assay for the detection of colorectal cancers. *World J Gastroenterol* 2017; 23: 2891-2898 [PMID: 28522907 DOI: 10.3748/wjg.v23.i16.2891]
  - 18 Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 9236-9241 [PMID: 10430926]
  - 19 Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, Hellemans J, Kubista M, Mueller RD, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT, Bustin SA. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem* 2013; 59: 892-902 [PMID: 23570709 DOI: 10.1373/clinchem.2013.206375]
  - 20 Olmedillas-López S, García-Olmo DC, García-Arriaza M, Guadalajara H, Pastor C, García-Olmo D. KRAS G12V Mutation Detection by Droplet Digital PCR in Circulating Cell-Free DNA of Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 484 [PMID: 27043547 DOI: 10.3390/ijms17040484]
  - 21 Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Lubber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih IM, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronesi S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014; 6: 224ra24 [PMID: 24553385 DOI: 10.1126/scitranslmed.3007094]
  - 22 Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 489-499 [PMID: 19536109 DOI: 10.1038/nrc2645]
  - 23 Zlobec I, Kovac M, Erzberger P, Molinari F, Bihl MP, Ruffe A, Foerster A, Frattini M, Terracciano L, Heinemann K, Lugli A. Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 2569-2575 [PMID: 20162668 DOI: 10.1002/ijc.25226]
  - 24 Lech G, Slotwiński R, Słodkowski M, Krasnodebski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 1745-1755 [PMID: 2685534 DOI: 10.3748/wjg.v22.i5.1745]
  - 25 Lyberopoulos A, Aravantinos G, Efsthathopoulos EP, Nikiteas N, Bouziotis P, Isaakidou A, Papalois A, Marinos E, Gazouli M. Mutational analysis of circulating tumor cells from colorectal cancer patients and correlation with primary tumor tissue. *PLoS One* 2015; 10: e0123902 [PMID: 25902072 DOI: 10.1371/journal.pone.0123902]
  - 26 Galanopoulos M, Papanikolaou IS, Zografos E, Viazis N, Papatheodoridis G, Karamanolis D, Marinos E, Mantzaris GJ, Gazouli M. Comparative Study of Mutations in Single Nucleotide Polymorphism Loci of KRAS and BRAF Genes in Patients Who Underwent Screening Colonoscopy, With and Without Premalignant Intestinal Polyps. *Anticancer Res* 2017; 37: 651-657 [PMID: 28179313 DOI: 10.21873/anticancer.11360]
  - 27 Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP, Kinzler KW, Vogelstein B. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* 2008; 135: 489-498 [PMID: 18602395 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.05.039]
  - 28 Azuara D, Ginesta MM, Gausachs M, Rodriguez-Moranta F, Fabregat J, Busquets J, Pelaez N, Boadas J, Galter S, Moreno V, Costa J, de Oca J, Capellà G. Nanofluidic digital PCR for KRAS mutation detection and quantification in gastrointestinal cancer. *Clin Chem* 2012; 58: 1332-1341 [PMID: 22745110 DOI: 10.1373/clinchem.2012.186577]
  - 29 Chang YS, Er TK, Lu HC, Yeh KT, Chang JG. Detection of KRAS codon 12 and 13 mutations by mutant-enriched PCR assay. *Clin Chim Acta* 2014; 436: 169-175 [PMID: 24863805 DOI: 10.1016/j.cca.2014.05.008]
  - 30 Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O'Connell A, Messineo MM, Luke JJ, Butaney M, Kirschmeier P, Jackman DM, Janne PA. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 1698-1705 [PMID: 24429876 DOI: 10.1158/1078-0432.